

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 6 月 16 日 (16.06.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/054464 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/09, 1/21, 5/10, C07K 14/435, 19/00, C12Q 1/02, G01N 21/78, 33/50, 33/533

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/018437

(22) 国際出願日: 2004 年 12 月 3 日 (03.12.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-404472 2003 年 12 月 3 日 (03.12.2003) JP
特願2004-018344 2004 年 1 月 27 日 (27.01.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 Saitama (JP). 株式会社医学生物学研究所 (MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.) [JP/JP]; 〒4600002 愛知県名古屋市中区丸の内 3 丁目 5 番 10 号 住友商事丸の内ビル 5 F Aichi (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 宮脇 敦史 (MIYAWAKI, Atsushi) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP). 小暮 貴子 (KOGURE, Takako) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP). 濱 裕 (HAMA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP). 金城 政孝 (KINJO, Masataka) [JP/JP]; 〒0600812 北海道札幌市北区北 1 2 条西 6 丁目 北海道大学電子科学研究所内 Hokkaido (JP). 齊藤 健太 (SAITO, Kenta) [JP/JP]; 〒0600812 北海道札幌市北区北 1 2 条西 6 丁目 北

海道大学電子科学研究所内 Hokkaido (JP). 唐澤 智司 (KARASAWA, Satoshi) [JP/JP]; 〒3960002 長野県伊那市大字手良沢岡字大原 1063-103 株式会社医学生物学研究所 伊那研究所内 Nagano (JP). 荒木 俊雄 (ARAKI, Toshio) [JP/JP]; 〒3960002 長野県伊那市大字手良沢岡字大原 1063-103 株式会社医学生物学研究所 伊那研究所内 Nagano (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: FLUORESCENT PROTEINS

(54) 発明の名称: 蛍光蛋白質

(57) Abstract: It is intended to provide a novel fluorescent protein which occurs as a monomer without forming a multimer; and a red or orange fluorescent protein characterized by achieving the maximum fluorescence at the maximum excitation by enlarging the difference between the excitation peak value (absorption peak wavelength) and the fluorescent peak value (fluorescent peak wavelength). Namely, a novel fluorescent protein having been monomerized by transferring a mutation into a fluorescent protein originating in *Fungia* sp.; and a novel pigment protein and a fluorescent protein originating in *Montipora* sp. .

(57) 要約: 本発明の目的は、多量体を形成することなく単量体で存在する新規な蛍光蛋白質、並びに励起のピーク値 (吸収極大波長) と蛍光のピーク値 (蛍光極大波長) の差 (ストークスシフト) を大きくすることにより、最大の励起で最大の蛍光を得ることができることを特徴とする赤色又は橙色の蛍光蛋白質を提供することである。本発明によれば、クサビライシ (*Fungia* sp.) 由来の蛍光蛋白質に変異を導入することにより単量体化した新規な蛍光蛋白質、並びにコモンサンゴ (*Montipora* sp.) 由来の新規な色素蛋白質及び蛍光蛋白質が提供される。

WO 2005/054464 A1

明細書

蛍光蛋白質

技術分野

本発明は、単量体で存在する新規な蛍光蛋白質に関する。より詳細には、本発明は、クサビライシ(*Fungia* sp.)由来の蛍光蛋白質に変異を導入することにより単量体化した新規な蛍光蛋白質及びその利用に関する。さらに本発明は、新規な色素蛋白質並びに蛍光蛋白質に関する。より詳細には、本発明は、コモンサンゴ(*Montipora* sp)由来の新規な色素蛋白質及び蛍光蛋白質、並びにその利用に関する。

背景技術

クラゲのエクオレア・ビクトリア(*Aequorea victoria*)に由来する緑色蛍光蛋白質(GFP)は、生物系において多くの用途を有する。最近、ランダム突然変異誘発法および半合理的(semi-rational)突然変異誘発法に基づいて、色を変化させたり、折りたたみ特性を改善したり、輝度を高めたり、あるいはpH感受性を改変したといった様々なGFP変異体が作製されている。遺伝子組み換え技術により他の蛋白質をGFP等の蛍光蛋白質に融合させて、それらの発現および輸送のモニタリングを行うことが行われている。

最もよく使用されるGFP変異体の一つとして黄色蛍光蛋白質(YFP)が挙げられる。YFPは、クラゲ(*Aequorea*) GFP変異体の中でも最長波長の蛍光を示す。大部分のYFPの ϵ および Φ は、それぞれ $60,000 \sim 100,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ および $0.6 \sim 0.8$ であり(Tsien, R. Y. (1998). *Ann. Rev. Biochem.* 67, 509-544)、これらの値は、一般的な蛍光団(フルオレセインおよびローダミンなど)の値に匹敵する。従ってYFPの絶対的輝度の改善は、ほぼ限界に達しつつある。

また、GFP変異体の他の例として、シアン色蛍光蛋白質(CFP)があり、ECFP (enhanced cyan fluorescent protein)が知られている。また、イソギ

ンチャク (*Discoma* sp.) からは赤色蛍光蛋白質 (RFP) も単離されており、DasRed が知られている。このように蛍光蛋白質は、緑色、黄色、シアン色、赤色の4種が次々と開発されスペクトルの範囲は大幅に広がっている。

先に本発明者らは、クサビライシ (*Fungia* sp.) の cDNA ライブラリーから、既知の蛍光蛋白質のアミノ酸配列に基づいて設計した好適なプライマーを用いて蛍光蛋白質遺伝子を増幅してクローニングすることに成功し、得られたクサビライシ (*Fungia* sp.) 由来の蛍光蛋白質の蛍光特性を調べた結果、当該蛍光蛋白質が所望の蛍光特性を有することを見出している (国際公開WO 03/54191号公報)。

また、オワンクラゲ由来の GFP ホモログの中には、ストークスシフト (励起のピーク値と蛍光のピーク値の差) の大きいタイプのもの (GFPuv、sapphire) があるが、380nm の UV 光で励起して緑色蛍光を取得するため、生物内での観察には毒性をもつ UV 光の使用は適さない。赤色蛍光蛋白質についてはストークスシフトの大きなものは存在せず、蛍光観察においては、励起もしくは蛍光のどちらかを犠牲にしなければならないのが現状である。

発明の開示

国際公開WO 03/54191号公報に記載されたイシサンゴ目のクサビライシより単離された蛍光蛋白質 Kusabira-Orange (K0) は分子量測定の結果、70 kDa (アミノ酸配列から計算される分子量は 26 kDa) を示し、通常は二量体を形成していると考えられる。近年、蛍光蛋白質をもちいて細胞や分子のラベルする需要が急速に高まっている。細胞をラベルする際には蛍光蛋白質が多量体を形成しようと、蛍光蛋白質自身は細胞質中に漂っているだけなので問題は起こらないが、分子をラベルする際には問題が生じてくる。例えば、ラベルしたい分子が多量体を形成する場合、ターゲット分子と蛍光蛋白質分子が互いに多量体を形成し合い、巨大なポリマーを形成してしまう可能性がある。また、どちらかの多量体形成が阻害された時には、その多量体形成できない分子が本来の性質を失うことになる。

蛍光蛋白質を複数用いた分子内 FRET（蛍光エネルギー共鳴移動）のプロープにおいても同様に、多量体形成蛍光蛋白質同士を一本のペプチド鎖として発現させた場合に、互いが多量体形成をしあうために FRET の観測は困難となる。本発明は、上記した問題を解消することを解決すべき課題とするものであり、具体的には、多量体を形成することなく単量体で存在する新規な蛍光蛋白質を提供することを解決すべき課題とした。

また、蛍光蛋白質は低分子の蛍光物質に比して励起と蛍光のスペクトルがブロードである。そして、多くの蛍光蛋白質では励起スペクトルと蛍光スペクトルの重なりがあるため、励起のピーク値で励起して蛍光のピーク値で観測することが非常に困難である。本発明は、上記した問題点を解消した蛍光蛋白質を提供することを解決すべき課題とした。即ち、本発明は、励起のピーク値（吸収極大波長）と蛍光のピーク値（蛍光極大波長）の差（ストークスシフト）を大きくすることにより、最大の励起で最大の蛍光を得ることができることを特徴とする赤色又は橙色の蛍光蛋白質を提供することを解決すべき課題とした。

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討し、国際公開 WO 03/54191 号公報に記載された蛋白質 K0 のアミノ酸配列から多量体形成界面を予測し、多量体形成界面のアミノ酸を置換し、なおかつ蛍光特性を保持するよう K0 の単量体化を行うことに成功した。さらに本発明者らは、得られた単量体蛍光蛋白質の蛍光特性を調べた結果、所望の蛍光特性を有することを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

さらに本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討し、材料としてコモンサンゴ (*Montipora. sp*) を用いて新規色素蛋白質をコードする遺伝子の単離を試み、色素蛋白質 COCP を取得した。次いで、COCP 蛋白質の 94 番目のヒスチジンをアスパラギンに、142 番目のアスパラギンをセリンに、157 番目のアスパラギンをアスパラギン酸に、201 番目のリジンをアルギニンに、206 番目のフェニルアラニンをセリンに置き換えることにより蛍光性を獲得した蛍光蛋白質 COCP-FL を作成した。COCP-FL は 560nm に励起のピークを持ち、この励起によって蛍光スペクト

ルは 600nm にピークした。さらに、本発明者らは、上記 COCP-FL の 61 番目のセリンをフェニルアラニンに、92 番目のイソロイシンをトレオニンに、123 番目のバリンをトレオニンに、158 番目のフェニルアラニンをチロシンに、191 番目のバリンをイソロイシンに、213 番目のセリンをアラニンに置き換えることにより COCP-FL とは異なる蛍光特性をもつ蛋白質 keima616 を作成した。keima616 は、440nm に励起のピークをもち、この励起によって蛍光スペクトルは 616nm にピークを持ち、ストークスシフトは 176nm と非常に大きな値であった。さらに、本発明者らは、Keima616 の 61 番目のフェニルアラニンをメチオニンに、62 番目のグルタミンをシステインに置き換えることにより蛍光蛋白質 Keima570 を作成した。この Keima570 は Keima616 と同様 440nm に励起のピークを持ち、この励起により 570nm の蛍光のピークを示し、ストークスシフトは 130nm と大きな値であった。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

即ち、本発明によれば、以下の (a) 又は (b) に示す蛍光蛋白質が提供される。

(a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と同等の蛍光特性を有し、かつ単量体で存在する蛋白質。

本発明の別の態様によれば、以下の (a) 又は (b) に示す蛍光蛋白質が提供される。

(a) 配列番号 3、5、7 又は 9 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号 3、5、7 又は 9 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、それぞれ配列番号 3、5、7 又は 9 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質。

本発明のさらに別の態様によれば、以下の (a) 又は (b) に示す蛍光蛋白質が提供される。

(a) 配列番号 1 1、1 3、1 5、1 7、1 9、2 1、2 3、2 5、2 7 又は 2 9 に記載のアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質；

(b) 配列番号 1 1、1 3、1 5、1 7、1 9、2 1、2 3、2 5、2 7 又は 2 9 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、それぞれ配列番号 1 1、1 3、1 5、1 7、1 9、2 1、2 3、2 5、2 7 又は 2 9 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質。

本発明のさらに別の態様によれば、以下の (a) 又は (b) に示す蛍光蛋白質をコードする DNA が提供される。

(a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質

(b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と同等の蛍光特性を有し、かつ単量体で存在する蛋白質。

本発明のさらに別の態様によれば、以下の (a) 又は (b) に示す蛍光蛋白質をコードする DNA が提供される。

(a) 配列番号 3、5、7 又は 9 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号 3、5、7 又は 9 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、それぞれ配列番号 3、5、7 又は 9 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質。

本発明のさらに別の態様によれば、以下の (a) 又は (b) に示す蛍光蛋白質をコードする DNA が提供される。

(a) 配列番号 1 1、1 3、1 5、1 7、1 9、2 1、2 3、2 5、2 7 又は 2 9 に記載のアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質；

(b) 配列番号 1 1、1 3、1 5、1 7、1 9、2 1、2 3、2 5、2 7 又は 2 9 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、それぞれ配列番号 1 1、1 3、1 5、1 7、

19、21、23、25、27又は29に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質：

本発明のさらに別の態様によれば、以下の（a）又は（b）に示すDNAが提供される。

（a）配列番号2に記載の塩基配列を有するDNA

（b）配列番号2に記載の塩基配列において、1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ配列番号2に記載の塩基配列がコードする蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質であって、単量体で存在する蛋白質をコードする塩基配列を有するDNA。

本発明のさらに別の態様によれば、以下の（a）又は（b）に示すDNAが提供される。

（a）配列番号4、6、8又は10に記載の塩基配列を有するDNA

（b）配列番号4、6、8又は10に記載の塩基配列において、1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつそれぞれ配列番号4、6、8又は10に記載の塩基配列がコードする蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質。

本発明のさらに別の態様によれば、以下の（a）又は（b）に示すDNAが提供される。

（a）配列番号12、14、16、18、20、22、24、26、28又は30に記載の塩基配列を有するDNA。

（b）配列番号12、14、16、18、20、22、24、26、28又は30に記載の塩基配列において、1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつそれぞれ12、14、16、18、20、22、24、26、28又は30に記載の塩基配列がコードする蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質。

さらにまた本発明によれば、以下の（a）又は（b）に示す色素蛋白質が提供される。

(a) 配列番号 37 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号 37 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、吸光特性を有する蛋白質。

本発明の別の態様によれば、以下の (a) 又は (b) に示す蛍光蛋白質が提供される。

(a) 配列番号 39 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号 39 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、蛍光特性を有する蛋白質。

本発明のさらに別の態様によれば、以下の (a) 又は (b) に示す蛍光蛋白質が提供される。

(a) 配列番号 41、43、45 又は 47 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号 41、43、45 又は 47 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、蛍光特性を有し、かつ 100 nm 以上のストークスシフトを有する蛋白質。

本発明のさらに別の態様によれば、以下の (a) 又は (b) に示す色素蛋白質をコードする DNA が提供される

(a) 配列番号 37 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号 37 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、吸光特性を有する蛋白質。

本発明のさらに別の態様によれば、以下の (a) 又は (b) に示す蛍光蛋白質をコードする DNA が提供される。

(a) 配列番号 39 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号 39 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、蛍光特性を有する蛋白質。

本発明のさらに別の態様によれば、以下の (a) 又は (b) に示す蛍光蛋白質をコードする DNA が提供される。

(a) 配列番号 41、43、45 又は 47 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号 41、43、45 又は 47 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、蛍光特性を有し、かつ 100 nm 以上のストークスシフトを有する蛋白質。

本発明のさらに別の態様によれば、以下の (a) 又は (b) に示す DNA が提供される。

(a) 配列番号 38 に記載の塩基配列を有する DNA；

(b) 配列番号 38 に記載の塩基配列において、1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ吸光特性を有する蛋白質をコードする塩基配列を有する DNA。

本発明のさらに別の態様によれば、以下の (a) 又は (b) に示す DNA が提供される。

(a) 配列番号 40 に記載の塩基配列を有する DNA；

(b) 配列番号 40 に記載の塩基配列において、1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ蛍光特性を有する蛋白質をコードする塩基配列を有する DNA。

本発明のさらに別の態様によれば、以下の (a) 又は (b) に示す DNA が提供される。

(a) 配列番号 42、44、46 又は 48 に記載の塩基配列を有する DNA；

(b) 配列番号 42、44、46 又は 48 に記載の塩基配列において、1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ、蛍光特性を有し、100 nm 以上のストークスシフトを有する蛋白質をコードする塩基配列を有する DNA。

本発明のさらに別の態様によれば、上記した本発明の DNA を有する組み換えベクターが提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、上記した本発明の DNA 又は組み換えベクターを有する形質転換体が提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、上記した本発明の蛍光蛋白質と他の蛋白質

とから成る融合蛍光蛋白質が提供される。好ましくは、他の蛋白質は細胞内に局在する蛋白質であり、さらに好ましくは、他の蛋白質は細胞内小器官に特異的な蛋白質である。好ましくは、他の蛋白質が蛍光蛋白質である。この場合、好ましくは、融合蛋白質は分子内 FRET を生じることができる。

本発明のさらに別の態様によれば、上記した本発明の融合蛋白質を細胞内で発現させることを特徴とする、細胞内における蛋白質の局在または動態を分析する方法が提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、上記した本発明の蛍光蛋白質、DNA、組み換えベクター、形質転換体、又は融合蛋白質を含む、蛍光試薬キットが提供される。

図面の簡単な説明

図 1 は、mK0 の吸収スペクトルを示す。

図 2 は、mK0 の励起スペクトル（点線）及び蛍光スペクトル（実線）を示す。

図 3 は、超遠心による分子量測定の結果を示す。測定結果より分子量は 28 kDa であることが分かった。

図 4 は、HeLa 細胞で K0（二量体）を用いてミトコンドリアをラベルした結果を示す。粒状になり正常なミトコンドリアの形態とは異なる。

図 5 は、HeLa 細胞で mK0（単量体）を用いてミトコンドリアをラベルした結果を示す。ひも状の正常なミトコンドリアの形態として観察される。

図 6 は、UV 励起緑色蛍光変異体 mKVU-1 の吸収スペクトルを示す。

図 7 は、UV 励起緑色蛍光変異体 mKVU-1 の励起スペクトル及び蛍光スペクトルを示す

図 8 は、青色蛍光変異体 mKUV-2 の吸収スペクトルを示す。

図 9 は、青色蛍光変異体 mKUV-2 の励起スペクトル及び蛍光スペクトルを示す

図 10 は、緑色蛍光変異体 mK0-FM32 の吸収スペクトルを示す。

図 11 は、緑色蛍光変異体 mK0-FM32 の励起スペクトル及び蛍光スペクトルを示す

す

図 1 2 は、赤色蛍光変異体 mK0-F90 の吸収スペクトルを示す。

図 1 3 は、赤色蛍光変異体 mK0-F90 の励起スペクトル及び蛍光スペクトルを示す

図 1 4 は、mK0 時間経過変異体の 580nm の励起スペクトルを示す。

図 1 5 は、mK0 時間経過変異体の 580nm の励起スペクトルを示す。

図 1 6 は、mK0 時間経過変異体の蛍光スペクトルを示す。

図 1 7 は、mK0 時間経過変異体の蛍光スペクトルを示す。

図 1 8 は、mK0 時間経過変異体の蛍光スペクトルを示す。

図 1 9 は、mK0 時間経過変異体の蛍光スペクトルを示す。

図 2 0 は、mK0 時間経過変異体の蛍光スペクトルを示す。

図 2 1 は、mK0 時間経過変異体の蛍光スペクトルを示す。

図 2 2 は、mK0 時間経過変異体の蛍光スペクトルを示す。

図 2 3 は、mK0 の合成後 25 時間まで 580nm の励起スペクトルを示す。

図 2 4 は、mK0 時間経過変異体の合成後 25 時間まで 580nm の励起スペクトルを示す。

図 2 5 は、mK0 時間経過変異体の合成後 25 時間まで 580nm の励起スペクトルを示す。

図 2 6 は、mK0 時間経過変異体の合成後 25 時間まで 580nm の励起スペクトルを示す。

図 2 7 は、mK0 時間経過変異体の合成後 25 時間まで 580nm の励起スペクトルを示す。

図 2 8 は、mK0 時間経過変異体の合成後 25 時間まで 580nm の励起スペクトルを示す。

図 2 9 は、mK0 時間経過変異体について、緑蛍光の励起ピーク部分の 500nm とオレンジ蛍光の励起ピークである 548nm の値の比のプロットを示す。

図 3 0 は、mK0-FM14 の N 末端に Tau を連結した融合蛋白質遺伝子を HeLa—S3

細胞に遺伝子導入して、イメージングを行った結果を示す。

図 3 1 は、mK0 蛋白質に強い緑色光を照射し、照射前後の吸収スペクトルを測定した結果を示す。

図 3 2 は、mK0-FM14 蛋白質に強い緑色光を照射し、照射前後の吸収スペクトルを測定した結果を示す。

図 3 3 は、BDNF-mK0-FM14 発現遺伝子ベクターの導入後、約 12 時間から 2 日間に細胞に発現した融合蛋白質を蛍光顕微鏡で検出し、強い緑色光を照射して、特定の領域のみオレンジ色蛍光を褪色させた結果を示す。

図 3 4 は、BDNF-mK0-FM14 発現遺伝子ベクターの導入後、約 12 時間から 2 日間に細胞に発現した融合蛋白質を蛍光顕微鏡で検出し、色の変化から分子 (BDNF-mK0-FM14) を追跡した結果を示す。

図 3 5 は、分子内 FRET を行うための蛍光蛋白質の模式図を示す。

図 3 6 は、単量体蛍光蛋白質 mK0 と 2 量体蛍光蛋白質 MiCy の蛍光スペクトルと吸収スペクトルを示す。

図 3 7 は、MiCy-linker-mK0 を用いて、Caspase3 との反応前と反応後の反応液の蛍光スペクトルを 440nm で励起して測定した結果を示す。

図 3 8 は、MiCy-linker-mK0 を用いて *in vivo* で Caspase3 の活性を測定した結果を示す。

図 3 9 は、COCP の吸収スペクトルを示す。

図 4 0 は、COCP の pH 感受性の測定結果を示す。

図 4 1 は、Keima616 の励起スペクトルと蛍光スペクトルを示す。

図 4 2 は、Keima570 の励起スペクトルと蛍光スペクトルを示す。

図 4 3 は、Keima616 の pH 感受性の測定結果を示す。

図 4 4 は、Keima570 の pH 感受性の測定結果を示す。

図 4 5 は、cmkeima620 の超遠心分子量測定の結果を示す。

図 4 6 は、cmkeima620 の吸収スペクトルを示す。

図 4 7 は、mkeima620 の吸収スペクトルを示す。

図 4 8 は、keima616 と ECFP の励起スペクトルと蛍光スペクトルを示す。

図 4 9 は、Caspase-3 の活性測定に用いた蛋白質モチーフを示す。

図 5 0 は、In vitro プロテアーゼ活性と相互相関を示す。リンカー部分に DEVD の配列を挿入したタンデム蛍光蛋白質のサンプルは 3 種 ECFP-Keima616、Keima616-ECFP、EGFP-mRFP1(x2)。(上段) caspase-3 を加える前の自己相関、相互相関関数。(中段) caspase-3 添加後の相互相関関数。(下段) 同添加後の蛍光強度。

図 5 1 は、各融合蛋白質モチーフにおける Relative amplitude を示す。

図 5 2 は、Caspase-3 によるペプチド鎖切断の検出(SDS-PAGE)を示す。

図 5 3 は、タンパク質間相互作用の検出に用いた融合蛋白質モチーフを示す。

図 5 4 は、CaCl₂ (+) 時の ECFP-CaM と M13-Keima 6 1 6 の蛍光相互相関関数を示す。

図 5 5 は、CaCl₂ (-) 時の ECFP-CaM と M13-Keima 6 1 6 の蛍光相互相関関数を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

(1) 本発明の蛋白質

(i) 本発明の第 1 の型の蛍光蛋白質

本発明の第 1 の型の蛍光蛋白質は、以下の (a) 又は (b) の何れかに示す蛋白質である。

(a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と同等の蛍光特性を有し、かつ単量体で存在する蛋白質。

本発明の蛍光蛋白質は、下記の特性を有することを特徴とする。

(1) 励起極大波長が 5 4 8 n m であり、蛍光極大波長は 5 5 9 n m である；

- (2) 548 nmにおけるモル吸光係数が、51600である；
- (3) 量子収率が0.6である；及び
- (4) 蛍光特性のpH感受性が $pK_a = 5.0$ である

クサビライシ (Fungia sp.) はサンゴの1種で、主に西部大西洋に生息し、群体の外形は多角形で触手が長く、全体が鮮やかなオレンジ色を呈することを特徴とする。

なお、本書中以下の実施例では、クサビライシ (Fungia sp.) を出発材料として上記特性を有する本発明の蛍光蛋白質を取得したが、クサビライシ (Fungia sp.) 以外の蛍光を発するサンゴから本発明の蛍光蛋白質を取得することができる場合もあり、そのような蛍光蛋白質も本発明の範囲内である。

本明細書で言う「1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列」における「1から数個」の範囲は特には限定されないが、例えば、1から20個、好ましくは1から10個、より好ましくは1から7個、さらに好ましくは1から5個、特に好ましくは1から3個程度を意味する。

本明細書で言う「同等の蛍光特性」とは、同等の蛍光強度、同等の励起波長、同等の蛍光波長、同等のpH感受性などを有することを意味する。

本発明の蛍光蛋白質の取得方法については特に制限はなく、化学合成により合成した蛋白質でもよいし、遺伝子組み換え技術による作製した組み換え蛋白質でもよい。

組み換え蛋白質を作製する場合には、先ず当該蛋白質をコードするDNAを入手することが必要である。本明細書の配列表の配列番号1から30に記載したアミノ酸配列並びに塩基配列の情報を利用することにより適当なプライマーを設計し、それらを用いて上記した国際公開WO 03/54191号公報に記載の蛍光蛋白質のcDNAクローンを鋳型にしてPCRを行うことにより、本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAを取得することができる。本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAの一部の断片を上記したPCRにより得た場合には、作製したDNA断片を順番に遺伝子組み換え技術により連結することにより、所望の蛍光蛋白質

質をコードするDNAを得ることができる。このDNAを適当な発現系に導入することにより、本発明の蛍光蛋白質を産生することができる。発現系での発現については本明細書中後記する。

さらに本発明によれば、上記した本発明の蛋白質（mKO）の変異体蛋白質も提供される。具体的には、以下の（a）又は（b）に示す蛍光蛋白質が提供される。

（a）配列番号3、5、7又は9に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；

（b）配列番号3、5、7又は9に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、それぞれ配列番号3、5、7又は9に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質。

さらに別の具体例としては、以下の（a）又は（b）に示す蛍光蛋白質が提供される。

（a）配列番号11、13、15、17、19、21、23、25、27又は29に記載のアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質；

（b）配列番号11、13、15、17、19、21、23、25、27又は29に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、それぞれ配列番号11、13、15、17、19、21、23、25、27又は29に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質。

（ii）本発明の第2の型の蛋白質

本発明の第2の型の蛋白質は、配列番号37、39、41、43、45又は47に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；並びに配列番号37、39、41、43、45又は47に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、吸光特性又は蛍光特性を有する蛋白質である。配列番号41、43、45又は47に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のストークスシフト（吸収極大波長と蛍光極大波長の差）はそれぞれ

176 nm、130 nm、180 nm、及び180 nmである。配列番号41、43、45又は47に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、蛍光特性を有する蛋白質については、そのストークスシフトは100 nm以上、より好ましくは120 nm以上になるものとする。

本発明の蛋白質は、下記の特性を有することを特徴とする。

(1) COCP (アミノ酸配列を配列番号37に示し、塩基配列を配列番号38に示す)

励起極大波長 (吸収極大波長): 576 nm

576 nmにおけるモル吸光係数: 64000

pH感受性: なし

(2) COCP-FL (アミノ酸配列を配列番号39に示し、塩基配列を配列番号40に示す)

励起極大波長 (吸収極大波長): 560 nm

蛍光極大波長: 600 nm

(3) keima616 (アミノ酸配列を配列番号41に示し、塩基配列を配列番号42に示す)

励起極大波長 (吸収極大波長): 440 nm

蛍光極大波長: 616 nm

pH感受性: pH 7.5 ~ 10 で蛍光強度は安定

(4) keima570 (アミノ酸配列を配列番号43に示し、塩基配列を配列番号44に示す)

励起極大波長 (吸収極大波長): 440 nm

蛍光極大波長: 570 nm

pH感受性: pH 7.5 ~ 10 で蛍光強度は安定

(5) cmkeima620 (アミノ酸配列を配列番号45に示し、塩基配列を配列番号46に示す)

励起極大波長（吸収極大波長）：440nm

蛍光極大波長：620nm

（6）mkeima620（アミノ酸配列を配列番号47に示し、塩基配列を配列番号48に示す）

励起極大波長（吸収極大波長）：440nm

蛍光極大波長：620nm

本明細書中の実施例においては、本発明の蛋白質をコードするDNAは、コモンサンゴ（*Montipora. sp*）を出発材料としてクローニングされた。コモンサンゴ（*Montipora. sp*）は、刺胞動物門花虫綱六放サンゴ亜綱イシサンゴ目ミドリイシ科に属するサンゴの1種であり、塊状や被覆状の群体を形成することが多い。なお、コモンサンゴ（*Montipora. sp*）以外の蛍光を発するサンゴから本発明の蛋白質を取得することができる場合もあり、そのような蛋白質も本発明の範囲内である。

本明細書で言う「1から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列」における「1から数個」の範囲は特には限定されないが、例えば、1から20個、好ましくは1から10個、より好ましくは1から7個、さらに好ましくは1から5個、特に好ましくは1から3個程度を意味する。

本明細書において、「吸光特性を有する蛋白質」とは一定の波長の光を吸収できる性質を有する蛋白質を意味する。「配列番号37に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、吸光特性を有する蛋白質」の吸光特性は、配列番号37に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質の吸光特性と実質的に同一でもよいし、異なってもよい。吸光特性は、例えば、吸光強度、励起波長（吸収波長）、pH感受性などにより評価することができる。本発明の蛋白質のうち吸光特性を有し、蛍光を発しない色素蛋白質は、（1）FRETのアクセプター分子（エネルギー受容体）として用いたり、（2）照射した光のエネルギーを光以外のエネルギーに変換させるシステムの開発に利用したり、あるいは（3）蛋白質のアミノ酸配列に変異を導入して蛍

光を発するように改変することなどに用いることができる。

本明細書において、「蛍光特性を有する蛋白質」とは、一定の波長の光で励起することにより蛍光を発することができる性質を有する蛋白質を意味する。「配列番号 39、41、43、45 又は 47 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、蛍光特性を有する蛋白質」の蛍光特性はそれぞれ、配列番号 39、41、43、45 又は 47 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質の蛍光特性と実質的に同一でもよいし、異なってもよい。蛍光特性は、例えば、蛍光強度、励起波長、蛍光波長、pH 感受性などにより評価することができる。

本発明の色素蛋白質又は蛍光蛋白質の取得方法については特に制限はなく、化学合成により合成した蛋白質でもよいし、遺伝子組み換え技術による作製した組み換え蛋白質でもよい。

組み換え蛋白質を作製する場合には、先ず当該蛋白質をコードする DNA を入手することが必要である。本明細書の配列表の配列番号 37、39、41、43、45 又は 47 に記載したアミノ酸配列並びに配列番号 38、40、42、44、46 又は 48 に記載した塩基配列の情報を利用することにより適当なプライマーを設計し、それらを用いてコモンサンゴ (*Montipora* sp.) 由来の cDNA ライブラリーを鋳型にして PCR を行うことにより、本発明の蛋白質をコードする DNA を取得することができる。本発明の蛋白質をコードする DNA の一部の断片を上記した PCR により得た場合には、作製した DNA 断片を順番に遺伝子組み換え技術により連結することにより、所望の蛋白質をコードする DNA を得ることができる。この DNA を適当な発現系に導入することにより、本発明の蛋白質を産生することができる。発現系での発現については本明細書中後記する。

(2) 本発明の DNA

本発明によれば、本発明の第 1 の型の蛍光蛋白質をコードする DNA が提供される。

本発明の第 1 の型の蛍光蛋白質をコードする DNA の具体例としては、以下の (a) 又は (b) に示す蛋白質をコードする DNA が挙げられる。

(a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質

(b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と同等の蛍光特性を有し、かつ単量体で存在する蛋白質。

本発明の蛍光蛋白質をコードする DNA の更なる具体例としては、以下の (a) 又は (b) に示す DNA もまた挙げられる。

(a) 配列番号 2 に記載の塩基配列を有する DNA

(b) 配列番号 2 に記載の塩基配列において、1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ配列番号 2 に記載の塩基配列がコードする蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質であって、単量体で存在する蛋白質をコードする塩基配列を有する DNA。

また、上記した (1) に記載した本発明の蛋白質 (mKO) の変異体蛋白質をコードする DNA も本発明の範囲内である。

さらに本発明によれば、本発明の第 2 の型の蛋白質をコードする DNA が提供される。

本発明の蛋白質をコードする DNA の具体例としては、以下の (a) 又は (b) に示す蛋白質をコードする DNA が挙げられる。

(a) 配列番号 37、39、41、43、45 又は 47 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号 37、39、41、43、45 又は 47 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、吸光特性又は蛍光特性を有する蛋白質。

本発明の色素蛋白質又は蛍光蛋白質をコードする DNA の更なる具体例としては、以下の (a) 又は (b) に示す DNA もまた挙げられる。

(a) 配列番号 38、40、42、44、46 又は 48 に記載の塩基配列を有す

るDNA；

(b) 配列番号38、40、42、44、46又は48に記載の塩基配列において、1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ吸光特性又は蛍光特性を有する蛋白質をコードする塩基配列を有するDNA。

本明細書で言う「1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列」における「1から数個」の範囲は特には限定されないが、例えば、1から50個、好ましくは1から30個、より好ましくは1から20個、さらに好ましくは1から10個、特に好ましくは1から5個程度を意味する。

本発明のDNAは、例えばホスホアミダイト法などにより合成することができるし、特異的プライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって製造することもできる。本発明のDNA又はその断片の作製方法については、本明細書中上述した通りである。

また、所定の核酸配列に所望の変異を導入する方法は当業者に公知である。例えば、部位特異的変異誘発法、縮重オリゴヌクレオチドを用いるPCR、核酸を含む細胞の変異誘発剤又は放射線への露出等の公知の技術を適宜使用することによって、変異を有するDNAを構築することができる。このような公知の技術は、例えば、Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989、並びに Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)に記載されている。

(3) 本発明の組み換えベクター

本発明のDNAは適当なベクター中に挿入して使用することができる。本発明で用いるベクターの種類は特に限定されず、例えば、自立的に複製するベクター（例えばプラスミド等）でもよいし、あるいは、宿主細胞に導入された際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、組み込まれた染色体と共に複製されるものであってもよい。

好ましくは、本発明で用いるベクターは発現ベクターである。発現ベクターにおいて本発明のDNAは、転写に必要な要素（例えば、プロモータ等）が機能的に連結されている。プロモータは宿主細胞において転写活性を示すDNA配列であり、宿主の種類に応じて適宜することができる。

細菌細胞で作動可能なプロモータとしては、バチルス・ステアロテルモフィルス・マルトジェニック・アミラーゼ遺伝子 (*Bacillus stearothermophilus maltogenic amylase gene*)、バチルス・リケニホルミス α アミラーゼ遺伝子 (*Bacillus licheniformis alpha-amylase gene*)、バチルス・アミロリケファチエンス・BAN アミラーゼ遺伝子 (*Bacillus amyloliquefaciens BAN amylase gene*)、バチルス・サブチリス・アルカリプロテアーゼ遺伝子 (*Bacillus Subtilis alkaline protease gene*) もしくはバチルス・プミルス・キシロシダーゼ遺伝子 (*Bacillus pumilus xylosidase gene*) のプロモータ、またはファージ・ラムダの P_R 若しくは P_L プロモータ、大腸菌の *lac*、*trp* 若しくは *tac* プロモータなどが挙げられる。

哺乳動物細胞で作動可能なプロモータの例としては、SV40 プロモータ、MT-1（メタロチオネイン遺伝子）プロモータ、またはアデノウイルス2主後期プロモータなどがある。昆虫細胞で作動可能なプロモータの例としては、ポリヘドリンプロモータ、P10 プロモータ、オートグラフィ・カリホルニカ・ポリヘドロシス塩基性蛋白プロモータ、バキュウロウイルス即時型初期遺伝子1プロモータ、またはバキュウロウイルス39K遅延型初期遺伝子プロモータ等がある。酵母宿主細胞で作動可能なプロモータの例としては、酵母解糖系遺伝子由来のプロモータ、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子プロモータ、TP11 プロモータ、ADH2-4c プロモータなどが挙げられる。

糸状菌細胞で作動可能なプロモータの例としては、ADH3 プロモータまたは *t p i A* プロモータなどがある。

また、本発明のDNAは必要に応じて、例えばヒト成長ホルモントーミネータまたは真菌宿主についてはTP11 トーミネータ若しくはADH3 トーミネータ

のような適切なターミネータに機能的に結合されてもよい。本発明の組み換えベクターは更に、ポリアデニレーションシグナル(例えばSV40またはアデノウイルス5E1b領域由来のもの)、転写エンハンサ配列(例えばSV40エンハンサ)および翻訳エンハンサ配列(例えばアデノウイルスVA RNAをコードするもの)のような要素を有していてもよい。

本発明の組み換えベクターは更に、該ベクターが宿主細胞内で複製することを可能にするDNA配列を具備してもよく、その一例としてはSV40複製起点(宿主細胞が哺乳類細胞のとき)が挙げられる。

本発明の組み換えベクターはさらに選択マーカ含有してもよい。選択マーカとしては、例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)またはシゾサッカロマイセス・ポンベTPI遺伝子等のようなその補体が宿主細胞に欠けている遺伝子、または例えばアンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ネオマイシン若しくはヒグロマイシンのような薬剤耐性遺伝子を挙げることができる。

本発明のDNA、プロモータ、および所望によりターミネータおよび/または分泌シグナル配列をそれぞれ連結し、これらを適切なベクターに挿入する方法は当業者に周知である。

(4) 本発明の形質転換体

本発明のDNA又は組み換えベクターを適当な宿主に導入することによって形質転換体を作製することができる。

本発明のDNAまたは組み換えベクターを導入される宿主細胞は、本発明のDNA構築物を発現できれば任意の細胞でよく、細菌、酵母、真菌および高等真核細胞等が挙げられる。

細菌細胞の例としては、バチルスまたはストレプトマイセス等のグラム陽性菌又は大腸菌等のグラム陰性菌が挙げられる。これら細菌の形質転換は、プロトプラスト法、または公知の方法でコンピテント細胞を用いることにより行えばよい。

哺乳類細胞の例としては、HEK 293細胞、HeLa細胞、COS細胞、BHK細胞、CHL細胞またはCHO細胞等が挙げられる。哺乳類細胞を形質転換し、該細胞に導入されたDNA配列を発現させる方法も公知であり、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等を用いることができる。

酵母細胞の例としては、サッカロマイセスまたはシズサッカロマイセスに属する細胞が挙げられ、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) またはサッカロマイセス・クルイベリ (*Saccharomyces kluyveri*) 等が挙げられる。酵母宿主への組み換えベクターの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、スフェロブラスト法、酢酸リチウム法等を挙げることができる。

他の真菌細胞の例は、糸状菌、例えばアスペルギルス、ニューロスポラ、フザリウム、またはトリコデルマに属する細胞である。宿主細胞として糸状菌を用いる場合、DNA構築物を宿主染色体に組み込んで組換え宿主細胞を得ることにより形質転換を行うことができる。DNA構築物の宿主染色体への組み込みは、公知の方法に従い、例えば相同組換えまたは異種組換えにより行うことができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる（例えば、Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual ; 及びカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Bio/Technology, 6, 47(1988)等に記載）。

バキュロウイルスとしては、例えば、ヨトウガ科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、*Spodoptera frugiperda* の卵巣細胞である Sf 9、Sf 21 [バキュロウイルス・エクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・

マニュアル、ダブリュー・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー(W. H. Freeman and Company)、ニューヨーク(New York)、(1992)]、*Trichoplusia ni*の卵巢細胞であるH i F i v e (インビトロジェン社製)等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法又はリポフェクション法等を挙げることができる。

上記の形質転換体は、導入されたDNA構築物の発現を可能にする条件下で適切な栄養培地中で培養する。形質転換体の培養物から、本発明の蛍光融合蛋白質を単離精製するには、通常の蛋白質の単離、精製法を用いればよい。

例えば、本発明の蛋白質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の蛋白質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)セファロース等のレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(ファルマシア社製)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

(5) 本発明の蛍光蛋白質及びそれを含む融合蛍光蛋白質の利用

本発明は蛍光蛋白質を他の蛋白質と融合させることにより、融合蛍光蛋白質を構築することができる。

本発明の融合蛍光蛋白質の取得方法については特に制限はなく、化学合成により合成した蛋白質でもよいし、遺伝子組み換え技術による作製した組み換え蛋白質でもよい。

組み換え蛋白質を作製する場合には、先ず当該蛋白質をコードするDNAを入手することが必要である。本明細書の配列表の配列番号1から30に記載したアミノ酸配列及び塩基配列の情報を利用することにより適当なプライマーを設計し、本発明の蛍光蛋白質の遺伝子を含むDNA断片を鋳型にしてPCRを行うことにより、本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAを構築するのに必要なDNA断片を作製することができる。また同様に、融合すべき蛋白質をコードするDNA断片も入手する。

次いで、これらのDNA断片を順番に遺伝子組み換え技術により連結することにより、所望の融合蛍光蛋白質をコードするDNAを得ることができる。このDNAを適当な発現系に導入することにより、本発明の融合蛍光蛋白質を産生することができる。

本発明の蛍光蛋白質は、特に、標識としての利用価値が高い。即ち、本発明の蛍光蛋白質を被検アミノ酸配列との融合蛋白質として精製し、マイクロインジェクション法などの手法により細胞内に導入し、該融合蛋白質の分布を経時的に観察すれば、被検アミノ酸配列の細胞内におけるターゲッティング活性を検出することが可能である。

本発明の蛍光蛋白質を融合させる他の蛋白質（被検アミノ酸配列）の種類は特に限定されるものではないが、例えば、細胞内に局在する蛋白質、細胞内小器官に特異的な蛋白質、ターゲティングシグナル（例えば、核移行シグナル、ミトコンドリアプレ配列）等が好適である。なお、本発明の蛍光蛋白質は、マイクロインジェクション法などにより細胞内に導入する以外に、細胞内で発現させて用いることも可能である。この場合には、本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAが発現可能に挿入されたベクターが宿主細胞に導入される。

また、本発明の蛍光蛋白質は、レポーター蛋白質としてプロモータ活性の測定に用いることも可能である。即ち、被検プロモータの下流に、本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAが配置されたベクターを構築し、これを宿主細胞に導入し、該細胞から発せられる本発明の蛍光蛋白質の蛍光を検出することにより、被検プ

ロモータの活性を測定することが可能である。被検プロモータとしては、宿主細胞内で機能するものであれば、特に制限はない。

上記アミノ酸配列のターゲティング活性の検出やプロモータ活性の測定において用いられるベクターとしては、特に制限はないが、例えば、動物細胞用ベクターでは、「pNEO」(P. Southern, and P. Berg (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:327)、「pCAGGS」(H. Niwa, K. Yamamura, and J. Miyazaki. Gene 108, 193-200 (1991))、「pRc/CMV」(インビトロゲン社製)、「pCDM8」(インビトロゲン社製)などが、酵母用ベクターでは、「pRS303」, 「pRS304」, 「pRS305」, 「pRS306」, 「pRS313」, 「pRS314」, 「pRS315」, 「pRS316」(R. S. Sikorski and P. Hieter (1989) Genetics 122: 19-27)、「pRS423」, 「pRS424」, 「pRS425」, 「pRS426」(T. W. Christianson, R. S. Sikorski, M. Dante, J. H. Shero, and P. Hieter (1992) Gene 110: 119-122)などが好適に用いられる。

また、使用可能な細胞の種類も特に限定されず、各種の動物細胞、例えば、L細胞、BalbC-3T3細胞、NIH3T3細胞、CHO(Chinese hamster ovary)細胞、HeLa細胞、NRK(normal rat kidney)細胞、「*Saccharomyces cerevisiae*」などの酵母細胞や大腸菌(*E. coli*)細胞などを使用することができる。ベクターの宿主細胞への導入は、例えば、リン酸カルシウム法やエレクトロポレーション法などの常法により行うことができる。

上記のようにして得た、本発明の蛍光蛋白質と他の蛋白質(蛋白質Xとする)とを融合させた融合蛍光蛋白質を細胞内で発現させ、発する蛍光をモニターすることにより、細胞内における蛋白質Xの局在や動態を分析することが可能になる。即ち、本発明の融合蛍光蛋白質をコードするDNAで形質転換またはトランスフェクトした細胞を蛍光顕微鏡で観察することにより細胞内における蛋白質Xの局在や動態を可視化して分析することができる。

例えば、蛋白質Xとして細胞内オルガネラに特異的な蛋白質を利用することにより、核、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、分泌小胞、ペルオキシソームなどの分布や動きを観察できる。

また、例えば、神経細胞の軸索、樹状突起などは発生途中の個体の中で著しく複雑な走向の変化を示すので、こういった部位を蛍光ラベルすることにより動的解析が可能になる。

本発明の蛍光蛋白質の蛍光は、生細胞のまま検出することが可能である。この検出は、例えば、蛍光顕微鏡（カールツァイス社 アキシオフォト フィルターセット 09）や画像解析装置（ATTO デジタルイメージアナライザー）などを用いて行うことが可能である。

顕微鏡の種類は目的に応じて適宜選択できる。経時変化を追跡するなど頻回の観察を必要とする場合には、通常の落射型蛍光顕微鏡が好ましい。細胞内の詳細な局在を追及したい場合など、解像度を重視する場合は、共焦点レーザー顕微鏡の方が好ましい。顕微鏡システムとしては、細胞の生理状態を保ち、コンタミネーションを防止する観点から、倒立型顕微鏡が好ましい。正立顕微鏡を使用する場合、高倍率レンズを用いる際には水浸レンズを用いることができる。

フィルターセットは蛍光蛋白質の蛍光波長に応じて適切なものを選択できる。本発明の蛍光蛋白質は、励起極大波長が 548 nm であり、蛍光極大波長が 559 nm であることから、励起光 530～550 nm、蛍光 550～600 nm 程度のフィルターを使用することが好ましい。

また、蛍光顕微鏡を用いた生細胞での経時観察を行う場合には、短時間で撮影を行うべきなので、高感度冷却 CCD カメラを使用する。冷却 CCD カメラは、CCD を冷却することにより熱雑音を下げ、微弱な蛍光像を短時間露光で鮮明に撮影することができる。

また、分子間の相互作用を分析する手法の一つとして、FRET（蛍光共鳴エネルギー転移）が知られている。FRET では、例えば、第一の蛍光蛋白質としてのシアン蛍光蛋白質（CFP）で標識した第一の分子と、第二の蛍光蛋白質としての黄色蛍光蛋白質（YFP）で標識した第二の分子とを共存させることにより、黄色蛍光蛋白質（YFP）をアクセプター分子として作用させ、シアン蛍光蛋白質（CFP）をドナー分子として作用させ、両者の間で FRET（蛍光共鳴

エネルギー転移)を生じさせることにより、第一の分子と第二の分子との間の相互作用を可視化することができる。即ち、FRETでは2種類の分子にそれぞれ異なる色素を導入し、エネルギーレベルの高い方の色素(ドナー分子)を選択的に励起し、その色素の蛍光を測定し、もう一方の色素(アクセプター分子)からの長波長蛍光も測定して、それらの蛍光変化量によって分子間の相互作用を可視化する。両方の色素が、2種類の分子の相互作用によって近接したときのみドナー分子の蛍光の減少とアクセプター分子の蛍光の増加が1波長励起2波長測光法により観測される。しかし、アクセプター分子に色素蛋白質を用いた場合は、両方の色素が、2種類の分子の相互作用によって近接したときのみドナー分子の蛍光の減少を生じ1波長励起1波長測光法により観測することができる。即ち、測定機器の簡易化が可能となる。

本発明の蛍光蛋白質及び色素蛋白質は、特に、FRET(蛍光共鳴エネルギー転移)におけるドナー分子及びアクセプター分子としての利用価値が高い。即ち、本発明の色素蛋白質と被験物質との融合体(第一の融合体)を作製する。次いで、該被験物質と相互作用する別の被験物質と別の蛍光蛋白質との融合体(第2の融合体)を作製する。そして、第一の融合体と第2の融合体とを相互作用させ、発する蛍光を分析することにより、上記2種類の被験物質間の相互作用を分析することができる。なお、本発明の色素蛋白質を用いたFRET(蛍光共鳴エネルギー転移)は、試験管内で行ってもよいし、細胞内で行ってもよい。

さらにまた、本発明の蛍光蛋白質又は色素蛋白質の何れか1種以上をドナー蛋白質又はアクセプター蛋白質として使用することによって、分析物質の標的配列の両端にドナー蛍光蛋白質とアクセプター蛍光蛋白質が結合している構造を有する蛍光指示薬を作成することもできる。分析物質の該標的配列への結合又は作用の有無により、指示薬の立体構造が変化し、これにより蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)の有無が生じさせることができる。

(6) 本発明のキット

本発明によれば、本明細書に記載した蛍光蛋白質、融合蛍光蛋白質、DNA、組み換えベクター又は形質転換体から選択される少なくとも1種以上を含むことを特徴とする、細胞内成分の局在の分析及び／又は生理活性物質の分析のためのキットが提供される。本発明のキットは、それ自体既知の通常用いられる材料及び手法で調製することができる。

蛍光蛋白質又はDNAなどの試薬は、適当な溶媒に溶解することにより保存に適した形態に調製することができる。溶媒としては、水、エタノール、各種緩衝液などを用いることができる。

以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例

実施例1：点変異導入による多量体形成阻害変異体の作製

K0-1のアミノ酸配列から多量体形成界面を予測し、多量体形成界面のアミノ酸を置換し、なおかつ蛍光特性を保持するようK0-1の単量体化を行った。点変異導入はK0-1を挿入した大腸菌発現ベクター（pRSET B）（国際公開WO 03/54191号公報に記載のK0-1をコードするDNAを有する発現ベクター）で点変異導入プライマーを用いて行った。具体的には鋳型プラスミドの片側鎖に複数の変異導入プライマーを同時にアニールさせ、ポリメラーゼで伸長させる。各プライマーにより伸長された各DNA断片を同反応液中でDNAリガーゼを用いてつなぎ、変異導入された部分以外が鋳型と相補的なものを得るという手法を行った。DNAリガーゼで各DNA断片をつなぐ際にDNAの末端にリン酸基を必要とするため、用いたプライマーは5'側のリン酸化を行った。

（1）プライマーの5'リン酸化

100 μ M	プライマー	2 μ l
10 \times	T4 polynucleotide kinase buffer	5 μ l
100 μ M	ATP	0.5 μ l

滅菌水 41.5 μ l

T4 polynucleotide kinase (10 U/ μ l) 1 μ l

上記混合物を 37°C で 30 分間インキュベートした。ここでプライマーとしては、以下の配列番号 3 から 17 に記載の塩基配列を有するプライマーを使用した。

K11R, F13Y

CCAGAGATGAAGATGAGGTACTACATGGACGGC (配列番号 59)

V25I

CATGAGTTCACAATTGAAGGTGAAGGC (配列番号 60)

K32R

GAAGGCACAGGCAGACCTTACGAGGGA (配列番号 61)

S55A

CCAATGCCTTTCGCGTTTGACTTAGTG (配列番号 62)

T62V

TTAGTGTCACACGTGTTCTGTTACGGC (配列番号 63)

Q96E

GAAAGGTCGTTGGAGTTCGAAGATGGT (配列番号 64)

F102S, A104S

GAAGATGGTGGGTCCGCTTCAGTCAGTGCG (配列番号 65)

C115T, E117Y

AGCCTTAGAGGAAACACCTTCTACCACAAATCCA (配列番号 66)

V123T

CAAATCCAAATTTACTGGGGTTAACTTTCCTG (配列番号 67)

V133I

GCCGATGGTCCTATCATGCAAAACCAAAGT (配列番号 68)

S139V

GCCGATGGTCCTATCATGCAAAACCAAAGTGTTGATTGGGAGCCA (配列番号 69)

T150A, C151S

GAGAAAATTACTGCCAGCGACGGAGTTCTGAAG (配列番号 7 0)

F162Y, A166E

GATGTTACGATGTACCTAAACTTGAAGGAGGCGGCAATCAC (配列番号 7 1)

Q190G, F193Y, G195S

CTTAAAATGCCAGGAAGCCATTACATCAGCCATCGCCTCGTCAGG (配列番号 7 2)

C217S

GATGCAGTAGCTCATTCCCTCGAGCACCACCACC (配列番号 7 3)

(2) 点変異導入 PCR

5' リン酸化プライマー	4 μ l
template (KO-pRSET B)	100ng
10 \times polymerase buffer	2.5 μ l
10 \times DNA ligase buffer	2.5 μ l
2.5mM dNTPs	1 μ l
polymerase (pfu) 2.5U/ μ l	1 μ l
Taq DNA ligase 40U/ μ l	0.5 μ l

滅菌水で計 50 μ l とする。

プログラム：

サーマルサイクラーは GeneAmp PCR system 9700 を使用した。

- 1) 65°C 5 min
- 2) 95°C 2 min
- 3) 95°C 20 sec
- 4) 52°C 20 sec
- 5) 65°C 8 min

上記の 3) ~ 5) を 25 サイクル繰り返す

- 6) 75°C 7 min
- 7) 4°C hold

(3) Dpn1 処理

PCR 後のサンプルに Dpn1 を $1\mu\text{l}$ 加えて 37°C に 1 時間インキュベートしてテンプレートプラスミドを切断した。

(4) 大腸菌への形質転換

Dpn1 処理後のサンプルを大腸菌 JM109 に形質転換して変異導入後の K0-1 を発現させた。

(5) 単量体化 Kusabira-Orange (mK0) のアミノ酸配列

変異導入後の K0 変異体の塩基配列を解析し、アミノ酸配列を決定した。その結果、11 番目のリジン (K) をアルギニン (R) に、13 番目のフェニルアラニン (F) をチロシン (Y) に、25 番目のバリン (V) をイソロイシン (I) に、32 番目のリジン (K) をアルギニン (R) に、55 番目のセリン (S) をアラニン (A) に、62 番目のトレオニン (T) をバリン (V) に、96 番目のグルタミン (Q) をグルタミン酸 (E) に、102 番目のフェニルアラニン (F) をセリン (S) に、104 番目のアラニン (A) をセリン (S) に、115 番目のシステイン (C) をトレオニン (T) に、117 番目のグルタミン酸 (E) をチロシン (Y) に、123 番目のバリン (V) をトレオニン (T) に、133 番目のバリン (V) をイソロイシン (I) に、139 番目のセリン (S) をバリン (V) に、150 番目のトレオニン (T) をアラニン (A) に、151 番目のシステイン (C) をセリン (S) に、162 番目のフェニルアラニン (F) をチロシン (Y) に、166 番目のアラニン (A) をグルタミン酸 (E) に、190 番目のグルタミン (Q) をグリシン (G) に、193 番目のフェニルアラニン (F) をチロシン (Y) に、195 番目のグリシン (G) をセリン (S) に、217 番目のシステイン (C) をセリン (S) に置換されていた。さらに Kozak 配列付加のため 2 番目のセリン (S) の前にバリン (V) を導入した。この変異体を mK0 とした。mK0 のアミノ酸配列を配列表の配列番号 1 に記載し、塩基配列を配列表の配列番号 2 に記載する。

大腸菌を用いて mK0 に His-Tag を付加した蛋白質を常法により発現させ、Ni-Agarose を用いて精製した。

実施例 2：蛍光特性の解析

実施例 1 で精製した mK0 蛋白質の蛍光及び吸収スペクトルを以下の通り測定し、量子収率およびモル吸光係数を算出した。

20 μ M 蛍光蛋白、50mM HEPES pH7.5 溶液を用いて吸収スペクトルを測定した。このスペクトルのピークの値よりモル吸光係数を計算した。mK0 では 548nm に吸収のピークが認められ、500nm における吸収が 0.0025 となるように蛍光蛋白を上記の緩衝液で希釈して、500nm で励起した時の蛍光スペクトルと 590nm における蛍光による励起スペクトルを測定した。DsRed (CLONTECH) を同様に 500nm における吸収が 0.0025 となるようにして蛍光スペクトルを測定し、DsRed の量子収率を 0.29 として mK0 の量子収率を求めた。

結果を表 1、図 1 及び図 2 に示す。表 1 には、国際公開 WO 03/54191 号公報に記載の K0 蛋白質（二量体蛋白質）のデータも併記する。

表1

	励起極大	蛍光極大	モル吸光係数	量子収率	アミノ酸数	多量体形成	pH感受性
KO	548 nm	561 nm	109750	0.45	217	二量体	pKa<5.0
mK0	548 nm	559 nm	51600	0.6	218	単量体	pKa=5.0

実施例 3：超遠心分析による分子量の測定

mK0 蛋白質溶液を 150mM KCl, 50mM HEPES-KOH pH7.4 とした。mK0 の分子量決定のため超遠心分析をおこなった。超遠心機 XL-1（ベックマン・コールター）を用いて 25,000rpm、22 時間遠心して、mK0 の吸収極大（548nm）付近の 540nm の吸収を測定した。その測定結果から mK0 の分子量は 28 kDa と計算された（図 3）。これはアミノ酸配列から予測される 26kDa とほぼ一致し、mK0 が単量体として存在することが確認された。

実施例 4 : ミトコンドリアへのターゲティング

KO および mKO の N 末端に、Yeast 由来の cytochrome oxidase サブユニット 4 の N 末端 12 アミノ酸 (MLSLRQSIRFFK) を付加し、HeLa 細胞のミトコンドリアへのターゲティングを行い、ミトコンドリアのラベルを行った。KO (二量体) は正確にターゲティングされずに、ミトコンドリアが粒々に染色されているのが確認された (図 4)。一方、mKO (単量体) は正確にミトコンドリアにターゲティングされ、細長い糸状のミトコンドリアが観察され、単量体化による有効性が確認された (図 5)。

実施例 5 : 蛍光特性の異なる mKO の変異体の作製

(1) 変異導入

mKO のアミノ酸を置換し、mKO とは異なった蛍光特性を持つ蛍光蛋白質の作製を行った。点変異導入は mKO を挿入した大腸菌発現ベクター (pRSET_B) に点変異導入プライマーをもちいて PCR をかけることにより行った。PCR に用いたプライマーは 5' 側のリン酸化を行った。

(a) プライマーの 5' リン酸化

100 μ M primer	2 μ l
10 \times T4 polynucleotide kinase buffer	5 μ l
100 μ M ATP	0.5 μ l
滅菌水	41.5 μ l
T4 polynucleotide kinase (10 U/ μ l)	1 μ l

37°C で 30 分間インキュベートした。

(b) 点変異導入 PCR

5' リン酸化プライマー	4 μ l
template (mKO-pRSET _B)	100ng
10 \times polymerase buffer	2.5 μ l

10× DNA ligase buffer	2.5 μ l
2.5mM dNTPs	1 μ l
polymerase (pfu) 2.5U/ μ l	1 μ l
Taq DNA ligase 40U/ μ l	0.5 μ l

滅菌水で計 50 μ l とする。

プログラム

サーマルサイクラーは GeneAmp PCR system 9700 を使用した。

- 1) 65°C 5 min
 - 2) 95°C 2 min
 - 3) 95°C 20 sec
 - 4) 52°C 20 sec
 - 5) 65°C 8 min
 - 6) 75°C 7 min
 - 7) 4°C hold
- 3) ~ 5) を 25 サイクル

(c) DpnI 処理

PCR 後のサンプルに DpnI を 1 μ l 加えて 37°C に 1 時間インキュベートしてテンプレートプラスミドを切断した。

(d) 大腸菌への形質転換

DpnI 処理後のサンプルを大腸菌 JM109 (DE3) に形質転換して変異導入後の mKO を発現させ解析を行なった。

(2) mKO 変異体のアミノ酸置換部位および蛍光特性

蛍光測定には、蛍光分光光度計 F-2500 (HITACHI) を使用した。吸収測定には分光光度計 U-3310 (HITACHI) を使用した。

(i) UV 励起緑色蛍光変異体 mKVU-1 (アミノ酸配列を配列番号 3 に示し、塩基配列を配列番号 4 に示す)

mK0 の 70 番目のプロリン (P) をシステイン (C) に、160 番目のバリン (V) をアスパラギン酸 (D) に、162 番目のメチオニン (M) をロイシン (L) に、176 番目のフェニルアラニン (F) をメチオニン (M) にアミノ酸置換することにより、505nm に蛍光ピークを持ち、398nm に励起のピークを持つ緑色蛍光蛋白質となった (図 6、7)。モル吸光係数は 10000 で、蛍光の量子収率は 0.27 となった。

(ii) 青色蛍光変異体 mKUV-2 (アミノ酸配列を配列番号 5 に示し、塩基配列を配列番号 6 に示す)

mK0 の 65 番目のシステイン (C) をグリシン (G) に、70 番目のプロリン (P) をグリシン (G) に、160 番目のバリン (V) をアスパラギン酸 (D) に、176 番目のフェニルアラニン (F) をメチオニン (M) にアミノ酸置換することにより、469nm に蛍光ピークを持ち、322nm に励起のピークを持つ青色蛍光蛋白質となった (図 8、9)。モル吸光係数は 12500 で、蛍光の量子収率は 0.2 となった。

(iii) 緑色蛍光変異体 mK0-FM32 (アミノ酸配列を配列番号 7 に示し、塩基配列を配列番号 8 に示す)

mK0 の 65 番目のシステイン (C) をアラニン (A) に、70 番目のプロリン (P) をグリシン (G) にアミノ酸置換することにより、506nm に蛍光ピークを持ち、493nm に励起のピークを持つ緑色蛍光蛋白質となった (図 10、11)。モル吸光係数は 27500 で、蛍光の量子収率は 0.44 となった。

(iv) 赤色蛍光変異体 mK0-F90 (アミノ酸配列を配列番号 9 に示し、塩基配列を配列番号 10 に示す)

mK0 の 41 番目のメチオニン (M) をロイシン (L) に、49 番目のリジン (K) をグルタミン酸 (E) に、69 番目のアルギニン (R) をリジン (K) に、145 番目のセリン (S) をトリプトファン (W) に、185 番目のリジン (K) をグルタミン酸 (E) に、188 番目のリジン (K) をグルタミン酸 (E) に、192 番目のセリン (S) をア

スパラギン酸 (D) にアミノ酸置換することにより、582nm に蛍光ピークを持ち、564nm に励起のピークを持つ赤色蛍光蛋白質となった (図 1 2、1 3)。モル吸光係数は 25000 で、蛍光の量子収率は 0.05 となった。

実施例 6 : 緑色とオレンジ色の 2 蛍光を発する mK0 の変異体の作製 (時間経過測定プローブおよび追跡プローブ)

mK0 のアミノ酸を置換し、mK0 とは異なった蛍光特性を持つ蛍光蛋白質の作製を行った。mK0 は翻訳されてからすぐは緑の蛍光を放ち、その後オレンジ色の蛍光を放つようになる。しかし、緑色蛍光からオレンジ色蛍光への移行はすばやく完了するために、通常はほとんど見られない。そこで、いろいろな時間経過に伴って緑色蛍光とオレンジ色蛍光の比の異なる蛍光蛋白質を作製した。この変異体を使用することによって蛋白質発現からの時間を緑色蛍光とオレンジ色蛍光の比で測定することができる。また、この変異体は緑色蛍光とオレンジ色蛍光が独立しているために、オレンジ色蛍光のみを消光させることができた。つまり、オレンジ色蛍光のみを消光させて、オレンジ色蛍光の増加を測定すれば、時間経過測定のリセットも可能となる。さらに、同じくオレンジ色のみ任意の部分を消光して、緑色蛍光とオレンジ色蛍光の比で測定すれば消光した部分のラベルした分子や細胞などの挙動を測定することもできる。結果としてわかったことは 70 番目のプロリン (P) をアミノ酸置換することにより、多様な、時間経過に伴って緑色蛍光とオレンジ色蛍光の比の異なる蛍光蛋白質を作製できることであった。

(1) 変異導入

mK0 のアミノ酸を置換し、mK0 とは異なった蛍光特性を持つ蛍光蛋白質の作製を行った。点変異導入は mK0 を挿入した大腸菌発現ベクター (pRSET_B) に点変異導入プライマーをもちいて PCR をかけることにより行った。PCR に用いたプライマーは 5' 側のリン酸化を行った。

(a) プライマーの 5' リン酸化

100 μ M primer

2 μ l

10× T4 polynucleotide kinase buffer	5 μ l
100 μ M ATP	0.5 μ l
滅菌水	41.5 μ l
T4 polynucleotide kinase (10 U/ μ l)	1 μ l

37°Cで30分間インキュベートした。

(b) 点変異導入 PCR

5' リン酸化プライマー	4 μ l
template (mKO-pRSET _B)	100ng
10× polymerase buffer	2.5 μ l
10× DNA ligase buffer	2.5 μ l
2.5mM dNTPs	1 μ l
polymerase (pfu) 2.5U/ μ l	1 μ l
Taq DNA ligase 40U/ μ l	0.5 μ l

滅菌水で計 50 μ l とする。

プログラム

サーマルサイクラーは GeneAmp PCR system 9700 を使用した。

- 1) 65°C 5 min
 - 2) 95°C 2 min
 - 3) 95°C 20 sec
 - 4) 52°C 20 sec
 - 5) 65°C 8 min
 - 6) 75°C 7 min
 - 7) 4°C hold
- 3) ~ 5) を 25 サイクル

(c) DpnI 処理

PCR 後のサンプルに Dpn1 を 1 μ l 加えて 37°C に 1 時間インキュベートしてテンプレートプラスミドを切断した。

(d) 大腸菌への形質転換

Dpn1 処理後のサンプルを大腸菌 JM109 (DE3) に形質転換して変異導入後の mK0 を発現させ解析を行なった。

(2) mK0 時間経過変異体の解析

作製された mK0 の変異体は塩基配列の解析により、49 番目のリジン (K) をグルタミン酸 (E) に、70 番目のプロリン (P) をグリシン (G) に、185 番目のリジン (K) をグルタミン酸 (E) に、188 番目のリジン (K) をグルタミン酸 (E) に、192 番目のセリン (S) をアスパラギン酸 (D) に、196 番目のセリン (S) をグリシン (G) にアミノ酸置換されていた。この mK0 の変異体は時間経過に伴って緑色蛍光とオレンジ色蛍光の比の異なる蛍光蛋白質であった。この mK0 の変異体の 70 番目のプロリン (P) をいろいろなアミノ酸に置換することにより、時間経過に伴う緑色蛍光とオレンジ色蛍光の比が変化する速度が変わった。

グリシン (G) に置換された変異体を mK0-FM9 とした (アミノ酸配列を配列番号 1 1 に示し、塩基配列を配列番号 1 2 に示す)。

アラニン (A) に置換された変異体を mK0-FM5 とした (アミノ酸配列を配列番号 1 3 に示し、塩基配列を配列番号 1 4 に示す)。

セリン (S) に置換された変異体を mK0-FM3 とした (アミノ酸配列を配列番号 1 5 に示し、塩基配列を配列番号 1 6 に示す)。

システイン (C) に置換された変異体を mK0-FM20 とした (アミノ酸配列を配列番号 1 7 に示し、塩基配列を配列番号 1 8 に示す)。

トレオニン (T) に置換された変異体を mK0-FM24 とした (アミノ酸配列を配列番号 1 9 に示し、塩基配列を配列番号 2 0 に示す)。

バリン (V) に置換された変異体を mK0-FM14 とした (アミノ酸配列を配列番号

2 1 に示し、塩基配列を配列番号 2 2 に示す)。

ロイシン (L) に置換された変異体を mK0-FM19 とした (アミノ酸配列を配列番号 2 3 に示し、塩基配列を配列番号 2 4 に示す)。

チロシン (Y) に置換された変異体を mK0-FM23 とした (アミノ酸配列を配列番号 2 5 に示し、塩基配列を配列番号 2 6 に示す)。

グルタミン (Q) に置換された変異体を mK0-FM21 とした (アミノ酸配列を配列番号 2 7 に示し、塩基配列を配列番号 2 8 に示す)。

アスパラギン (N) に置換された変異体を mK0-FM25 とした (アミノ酸配列を配列番号 2 9 に示し、塩基配列を配列番号 3 0 に示す)。

それぞれの mK0 時間経過変異体の測定は大腸菌 JM109 (DE3) で発現させたりコンビナント蛍光蛋白質でおこなうか、in vitro トランスレーションシステム PURE SYSTEM CLASSIC MINI (ポストゲノム研究所) を使用した。大腸菌での測定は各変異体を発現させた培養プレート を 37℃ に保温し、時間を追ってサンプリングして 580nm の励起スペクトルを測定した (図 1 4、1 5)。その結果、緑蛍光の励起ピークである約 500nm のピークにくらべ、オレンジ蛍光の励起ピークである 548nm のピークが時間により増加し、各変異体によってその増加率は違った。緑蛍光のピークは 509nm、オレンジ蛍光のピークは 560nm であった (図 1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2 ; それぞれカッコ内の波長で励起)。蛍光測定には蛍光分光光度計 F-2500 (HITACHI) を使用した。大腸菌内では新たな蛋白質が断続的に生産されるために、緑からオレンジへの推移に必要とされる時間が見かけ上長くなってしまふ。そこで、in vitro トランスレーションシステムを使用することによって蛋白質の生産時間を限定し、より正確な時間に伴う緑からオレンジへの推移を測定した。蛋白質合成時間は 1 時間とした。その直後に ATP などのタンパク質合成に必要なエネルギー源をゲルろ過で除き、37℃ に保温して合成後 25 時間まで 580nm の励起スペクトルを測定した (図 2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8)。緑蛍光の励起ピーク部分の 500nm とオレンジ蛍光の励起ピークである 548nm の値の比をプロットすると、これらが比較的にアミノ酸の側鎖が大きくなるに従い (G

→A→S→C→T→V→P)、オレンジ色蛍光成分への推移が速くなる傾向があることが分かった (図 29)。

mKO-FM14 の N 末端に Tau (チューブリンなどに結合し微小管重合を促進し安定化させる蛋白質) を遺伝子的に繋いだ融合蛋白質遺伝子 (アミノ酸配列を配列番号 31 に示し、塩基配列を配列番号 32 に示す) を動物細胞発現ベクター pCDNA3 の BamH1-Xho1 サイトにサブクローニングした。作製したベクターを Polyfect (キアゲン) を用いて HeLa-S3 細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入 23 時間後に培養液から HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) 溶液に置換してイメージングをおこなった。その結果、HeLa-S3 細胞がベクターを細胞内に取り込んだ時間差によって、緑色～オレンジ色まで様々な色調の細胞が観察された。オレンジ色/緑色の比から細胞 4 と細胞 5 はベクターを早い時間に細胞内に取り込んで、つづいて細胞 1、後に細胞 2 と細胞 3 がベクターを細胞内に取り込んでいることが確認できた (図 30)。顕微鏡は IX-70 (OLYMPUS) を用いた。緑色成分検出のために、励起フィルターは 470DF35 (OMEGA)、蛍光フィルターは HQ525/50M (CHROMA)、ダイクロイックミラーは 505DRLP (OMEGA) を用いた。オレンジ色成分検出のために、励起フィルターは HQ500/40X (CHROMA)、蛍光フィルターは OG550 (OMEGA)、ダイクロイックミラーは Q530LP (CHROMA) を用いた。

(3) mKO 時間経過変異体による分子の追跡

リコンビナント mKO-FM14 蛋白質に強い緑色光を照射して、リコンビナント mKO-FM14 蛋白質のオレンジ色蛍光成分のみを退色させることができるかを実験した。100W のキセノンランプに直接フィルターを装着して、強い緑色光をリコンビナント mKO-FM14 蛋白質に照射した。フィルターは 546DF20 (OMEGA) を使用した。コントロールとしてリコンビナント mKO 蛋白質も同時に強い緑色光を照射して、照射前後の吸収スペクトルを測定し、548nm の吸収値が低下するかを調べた。吸収測定には分光光度計 U-3310 (HITACHI) を使用した。その結果、コントロールに用いたリコンビナント mKO 蛋白質の 548nm の吸収値は変化しなかった。それ

に対してリコンビナント mKO-FM14 蛋白質の 548nm の吸収値は優位に低下した。しかし、緑色蛍光成分を発するのに必要である 500nm の吸収ピークに変化はなかった（図 3 1、3 2）。これは、mKO-FM14 蛋白質に強い緑色光を照射することによって、オレンジ蛍光成分のみを無くす、もしくは低下させることができることを示す。また、mKO-FM14 蛋白質または mKO-FM14 蛋白質を付加したものが満たされた空間において、局所のための強い緑色光照射によるオレンジ色蛍光の消光または低下により、オレンジ色蛍光シグナルと緑色蛍光シグナルの比を計算すれば、その部位をラベルすることができる。そこで mKO-FM14 の N 末端に BDNF (brain derived neurotrophic factor) を融合した融合蛋白質遺伝子（アミノ酸配列を配列番号 3 3 に示し、塩基配列を配列番号 3 4 に示す）を pEGFP-N1 (clontech) から EGFP 部分を抜き出したものにサブクローニングした。ラット海馬のニューロンに発現させてイメージングを行なった。

ラット海馬のニューロンを用意した。妊娠ラット(17-19 日目)の胎仔、あるいは生後 1-3 日目のラットの新生仔より顕微鏡下で海馬（約 10 匹分）を摘出した。次いで海馬を消化酵素パパインで十数分間、加温処理を行い、さらにピペットを用いて機械的に分散させ神経細胞に富む海馬細胞懸濁液を得た。必要に応じてこの懸濁液を培地で希釈し、ポリリジンなどの細胞接着基質をコーティングした直径 35 mm の培養皿の表面に播種した。播種密度 2-4 万細胞/cm² 程度とし、これらの細胞を培養皿の表面に接着させ、牛胎仔血清および N2-supplement（神経細胞用添加物）を含むイーグル培地を用いて高密度での初代培養を行なった。培養開始後 6-7 日目の細胞に対して 35 mm の培養皿 1 枚当たり 2-4 マイクログラムの DNA をリン酸カルシウム法により 37 度で 30 分間、BDNF—mKO-FM14 発現遺伝子ベクターの導入を行なった。この遺伝子導入の後、約 12 時間から 2 日間に細胞に発現した蛍光タンパクを蛍光顕微鏡で検出し色の変化を追跡する実験に用いた。緑色蛍光シグナル励起には 490DF20 (OMEGA) に 10%減光フィルターを装着したものを、緑色蛍光シグナル検出フィルターは 535DF35 (OMEGA) を用いた。オレンジ色蛍光シグナル励起には 546DF10 (OMEGA) を、オレンジ色蛍光シグナル検出フィル

ターは 595RDF60 (OMEGA) を用いた。ダイクロイックミラーは 505DRLPXR (OMEGA) を使用した。視野絞りを調節して、ラット海馬ニューロンのソーマ部分 (細胞体) のみを、550DF30 (OMEGA) を使用して強い緑色光でオレンジ色蛍光のみを退色させた。オレンジ色蛍光シグナル/緑色蛍光シグナルの比 (Ratio) から計算しソーマから神経突起への BDNF—mKO-FM14 の移動を観察した (図 3 3、3 4)。図 3 4 の白矢印は BDNF—mKO-FM14 がソーマ部分から神経突起の先端へ向かって移動している様子を示す。

実施例 7 : 単量体蛍光蛋白質 mKO と 2 量体 (多量体) 蛍光蛋白質 MiCy を用いた Caspase3 活性測定プローブ

分子内 FRET を行う際は少なくとも一種は単量体であるべきである。(A) 単量体 (白) と 2 量体 (黒) の組み合わせ (図 3 5 A)。2 量体 (多量体) 蛍光蛋白質 MiCy と単量体蛍光蛋白質 mKO の組み合わせはこのパターンとなる。例えば、2 量体 (白) と 2 量体 (黒) の組み合わせはポリマーのように連なってしまふことが考えられる (図 3 5 B)。単量体蛍光蛋白質 mKO と 2 量体蛍光蛋白質 MiCy は MiCy の蛍光スペクトルと mKO の吸収スペクトルに重なりがあるため、両者を用いた FRET (蛍光共鳴エネルギー移動法) 測定が可能である (図 3 6)。そこで、MiCy と mKO を Caspase3 の認識配列である DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) を含んだリンカーでつなぎ (アミノ酸配列を配列番号 3 5 に示し、塩基配列を配列番号 3 6 に示す)、Caspase3 の活性化に伴うリンカー配列の切断を FRET により測定した。

(1) in vitro での Caspase3 活性測定

MiCy—linker—mKO の順に繋ぎ、大腸菌発現ベクター pRSET_B の BamH1-EcoR1 サイトにサブクローニングして大腸菌 JM109 (DE3) に発現させた。リンカーの配列は GGSGGDEVDTGGS (Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Asp-Glu-Val-Asp-Gly-Thr-Gly-Gly-Ser) を用いた。このコンストラクトを MiCy-DEVD-mKO とした。発現したリコンビナント融合蛋白質は Ni-NTA アガロースで精製した。精製したリコンビナント融合蛋白質

白質をセファデックス G-25 カラムでゲルろ過を行い 150mM KCl、50mM HEPES-KOH pH7.4 溶液にバッファー置換した。活性測定にはリコンビナント Active-Caspase 3 (MBL:BV-1083-9) を用いた。20mM HEPES-KOH pH7.4、100mM NaCl、0.1% CHAPS、10% sucrose 溶液中に各リコンビナント融合蛋白質を 1mg/ml になるようにして、リコンビナント Active-Caspase3 を 1unit 加えて 30 度で 3 時間反応させた。反応前と反応後の反応液の蛍光スペクトルを 440nm で励起して測定した。測定には蛍光分光光度計 F-2500 (HITACHI) を使用した。その結果、Caspase3 添加前は FRET がおこって mK0 の蛍光ピーク (559nm) が現れているが、添加後にはリンカーの切断による FRET の解消により mK0 の蛍光ピーク (559nm) は消失し、MiCy の蛍光ピーク (495nm) のみとなった (図 3 7)。

(2) in vivo での Caspase3 活性測定

MiCy-DEVD-mK0 を動物細胞での発現ベクター pCS2+ の BamHI-EcoRI サイトにサブクローニングした。作製したベクターを Polyfect (キアゲン) を用いて HeLa-S3 細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入 24 時間後に培養液から 500ng/ml 抗 Fas 抗体 (CH-11:MBL)、10 μ g/ml サイクロヘキシミド、HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) 溶液に置換してアポトーシスを誘導し、Caspase3 活性測定のイメージングをおこなった。

顕微鏡は IX-70 (OLYMPUS) を用いた。励起フィルターは 440AF21 (OMEGA)、ダイクロイックミラーは 455DRLP (OMEGA) を用いた。蛍光シグナルの検出は 480ALP (OMEGA) のフィルターを通してカラー 3CCD カメラ ASHURA (浜松ホトニクス) で行い、Green チャンネルで MiCy の蛍光シグナルを、Red チャンネルで mK0 の蛍光シグナルを検出した。その結果、HeLa 細胞でのアポトーシスに伴い、Caspase3 が活性化されて導入遺伝子の翻訳産物のリンカーが切断され、FRET が解消して Red チャンネルのシグナルが低下し、Green チャンネルのシグナルが上昇する現象が観察された。Red/Green の Ratio (比) は Caspase3 の活性化に伴い低下した。また、HeLa 細胞のアポトーシスによる形態変化も観察された (図 3 8)。

実施例 8 : イシサンゴからの新規色素蛋白遺伝子の単離、新規蛍光蛋白の作製、及び特性解析

(1) total RNA の抽出

珊瑚より色素蛋白質の遺伝子の単離を行った。材料にはコモンサンゴ (*Montipora. sp*) を用いた。凍結したコモンサンゴを乳鉢で砕き、湿重量 1 グラムに” TRIZol” (GIBCO BRL) を 7.5ml 加えてホモジナイズし、1500×g で 10 分間遠心した。上清にクロロホルム 1.5ml を加え、15 秒間攪拌した後、3 分間静置した。7500×g で 15 分間遠心した。上清にイソプロパノール 3.75ml を加え、15 秒間攪拌した後、10 分間静置した。17000×g で 10 分間遠心した。上清を捨て、70%エタノールを 6ml 加えて 17000×g で 10 分間遠心した。上清を捨て、沈殿を DEPC 水 200 μ l で溶解した。DEPC 水で溶解した total RNA を 100 倍に希釈して、O.D. 260 と O.D. 280 の値を測定して RNA 濃度を測った。53 μ g の total RNA を得た。

(2) First strand cDNA の合成

total RNA 4 μ g を使用し、First strand cDNA の合成キット” Ready To Go” (Amersham Pharmacia) により cDNA (33 μ l) を合成した。

(3) Degenerated PCR

合成した First strand cDNA (33 μ l) のうち 3 μ l を鋳型として PCR を行った。プライマーのデザインは既知の蛍光蛋白のアミノ酸配列を見比べて、似ている部分を抜き出し、塩基配列に変換し直し作製した。

使用プライマー

5' - GAAGGRTGYGTCAAYGGRCAY -3' (primer1) (配列番号 74)

5' - ACVGGDCCATYDGVAAGAAARTT -3' (primer2) (配列番号 75)

I はイノシン、R は A 又は G、Y は C 又は T、V は A, C 又は G、D は A, G 又は T S は C 又は G、H は A, T 又は C を示す。

PCR 反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 μ l
X10 taq バッファー	5 μ l
2.5mM dNTPs	4 μ l
100 μ M primer1	1 μ l
100 μ M primer2	1 μ l
ミリ Q	35 μ l
taq polymerase (5U/ μ l)	1 μ l

PCR 反応条件

94°C 1 分 (PAD)

94°C 30 秒 (変性)

52°C 30 秒 (鋳型へのプライマーのアニーリング)

72°C 1 分 (プライマーの伸長)

上記 3 ステップを 35 サイクル行った。

72°C 7 分 (最後の伸長)

4°C 保持

一回目の PCR 反応で得られた増幅産物 1 μ l をテンプレートとして、もう一度同じ条件で PCR を行った。アガロースゲル電気泳動で、350bp を切り出し、精製した。

(4) サブクローニング及び塩基配列の決定

精製した DNA 断片を pT7-blue vector (Novagen) にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入された DNA 断片の塩基配列を DNA シーケンサーにより決定した。得られた塩基配列を他の蛍光蛋白遺伝子の塩基配列と比較してその DNA 塩基配列が蛍光蛋白由来のものであるかを判断した。蛍光蛋白遺伝子の一部であると判断したものに関して、5' -RACE 法およ

び 3' -RACE 法による遺伝子全長のクローニングを行った。

(5) 5' -RACE 法

Degenerated PCR で得られた DNA 断片の 5' 側の塩基配列を決定するために 5' -RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (GIBCO BRL) を用いて、5' -RACE 法を行った。鋳型として (1) で調整した total RNA を 5 μ g 使用した。

dC-tailed cDNA の一回目の増幅には

5' -GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3' (primer3) (配列番号 76)

5' - CTCAGGGAATGACTGCTTTACAT -3' (primer4) (配列番号 77)

のプライマーを用いた。

I はイノシンを示す。

二回目の増幅には

5' -GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3' (primer5) (配列番号 78)

5' - GTCTTCAGGGTACTTGGTGA -3' (primer6) (配列番号 79)

のプライマーを用いた。PCR 反応条件等はキットのプロトコールに準じた。

アガロースゲル電気泳動で、増幅された 350bp のバンドを切り出し、精製した。精製した DNA 断片を pT7-blue vector (Novagen) にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセレクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入された DNA 断片の塩基配列を DNA シークエンサーにより決定した。

(6) 3' -RACE 法

Degenerated PCR で得られた DNA 断片の 3' 側部分は、(4) の塩基配列決定で得られた情報を基に作製したプライマーとオリゴ dT プライマーの PCR で得た。鋳型として (2) で調整した first strand cDNA を 3 μ l 使用した。

作成したプライマーは、

5' - ATGTAAAGCAGTCATTCCTGAG -3' (primer7) (配列番号 80)

PCR 反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 μ l
X10 taq バッファー	5 μ l
2.5mM dNTPs	4 μ l
20 μ M primer7	1 μ l
10 μ M オリゴ dTprimer	1 μ l
ミリ Q	35 μ l
taq polymerase (5U/ μ l)	1 μ l

PCR 反応条件

94°C 1min (PAD)

94°C 30sec (変性)

52°C 30sec (鋳型へのプライマーのアニーリング)

72°C 1min (プライマーの伸長)

上記 3 ステップを 30 サイクル行った。

72°C 7min (最後の伸長)

4°C 保持

アガロースゲル電気泳動で、増幅された約 650bp のバンドを切り出し、精製した。精製した DNA 断片を pT7-blue vector (Novagen) にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセレクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入された DNA 断片の塩基配列を DNA シーケンサーにより決定した。

(7) 大腸菌での蛋白発現

得られた全長の塩基配列より、蛋白の N 末端に相当する部分でプライマーを作製し、C 末端側はオリゴ dT プライマーを使用して、(2) で調整した First strand cDNA を鋳型として PCR を行った。全アミノ酸配列および全塩基配列を配列表の配

列番号 37 及び 38 に示す。配列番号 37 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を COCP と称する。

使用プライマー

5' - CCCGGATCCGACCATGGCTACCTTGGTTAAAGA -3' (primer8) (配列番号 81)

PCR 反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 μ l
X10 pyrobest バッファー	5 μ l
2.5mM dNTPs	4 μ l
100uM primer8	1 μ l
100uM オリゴ dT プライマー	1 μ l
ミリ Q	35 μ l
pyrobest polymerase (5U/ μ l)	1 μ l

PCR 反応条件

94°C 1min (PAD)

94°C 30sec (変性)

52°C 30sec (鋳型へのプライマーのアニーリング)

72°C 1min (プライマー伸長)

上記 3 ステップを 30 サイクル行った。

72°C 7min (最後の伸長)

4°C 保持

アガロースゲルの電気泳動で、増幅された約 800bp のバンドを切り出し、精製して pRSET vector (Invitrogen) の *Bam*H I、*Eco*R I 部位にサブクローニングして、大腸菌株 (JM109-DE3) で発現させた。発現蛋白は N 末端に His-tag が付くようにコンストラクトしたので発現蛋白は Ni-Agarose gel (QIAGEN) で精製した。精製の方法は付属のプロトコールに準じた。次に精製した蛋白の性質を解析した。

(8) 光吸収特性の解析

20 μ M 色素蛋白、50mM HEPES pH7.9 溶液を用いて吸収スペクトルを測定した。このスペクトルのピークの値よりモル吸光係数を計算した。コモンサンゴ由来色素蛋白 (COCP) では 576nm に吸収のピークが認められた (表 2、図 39)。また、pH4~10 で安定していた。(図 40)

表 2

Montipora.spより単離された色素蛋白質(COCP)の特性

	吸収極大	蛍光極大	モル吸光係数	量子収率	pH感受性	アミノ酸数
COCP	576nm	—	64000(576nm)	—	なし	221a.a.
keima616	440nm	616nm	28000(440nm)	0.24	あり	222a.a.

(9) 色素蛋白質から蛍光蛋白質への改変

COCP は蛍光蛋白質ではない。しかし COCP の 1 番目のメチオニンと 2 番目のセリンの間にバリンを挿入し、94 番目のヒスチジンをアスパラギンに、142 番目のアスパラギンをセリンに、157 番目のアスパラギンをアスパラギン酸に、202 番目のリジンをアルギニンに、206 番目のフェニルアラニンをセリンに置き換えることにより蛍光性を獲得した。この改変蛍光蛋白質を COCP-FL とした (アミノ酸配列を配列番号 39 に示し、塩基配列を配列番号 40 に示す)。COCP-FL は 560nm に励起のピークを持つ。この励起によって蛍光スペクトルは 600nm にピークを示す。

(10) ストークスシフトの大きな赤色蛍光蛋白質の作製

COCP-FL の 62 番目のセリンをフェニルアラニンに、93 番目のイソロイシンをトレオニンに、124 番目のバリンをトレオニンに、159 番目のフェニルアラニンをチロシンに、192 番目のバリンをイソロイシンに、214 番目のセリンをアラニンに置き換えることにより COCP-FL とは異なる蛍光をもつ蛋白質を獲得した。この改変蛍光蛋白質を keima616 (アミノ酸配列を配列番号 41 に示し、塩基配列を配列番

号 4 2 に示す) とした。440nm に励起のピークをもち、この励起によって蛍光スペクトルは 616nm にピークを持つ(図 4 1、表 2)。ストークスシフトは 176nm と非常に大きな値である。従来の蛍光蛋白質に比べ励起波長域と蛍光波長域を大きくとることができ、蛍光測定時に効率よく測定できる。また、同時多色蛍光測定も可能である。同一励起波長をもつ蛍光色素を用いることによりレーザーなど単一波長での励起による二つの波長での測光ができる。いままでの蛍光蛋白では同じ励起スペクトルをもつ蛋白がないためできなかったことで、これらの蛋白を用いることで励起のちがいによる測定のぶれという問題を解決できる。

(1 1) ストークスシフトの大きな橙色蛍光蛋白質の作製

Keima616 の 62 番目のフェニルアラニンをメチオニンに、63 番目のグルタミンをシステインに置き換えることにより蛍光蛋白質を獲得した。この改変蛍光蛋白質を Keima570 (アミノ酸配列を配列番号 4 3 に示し、塩基配列を配列番号 4 4 に示す) とした。この Keima570 は Keima616 と同様 440nm に励起のピークを持ち、この励起により 570nm の蛍光のピークを示す(図 4 2)。ストークスシフトは 130nm と大きな値である。従来の蛍光蛋白質に比べ励起波長域と蛍光波長域を大きくとることができ、蛍光測定時に効率よく測定できる。また、同時多色蛍光測定も可能である。同一励起波長をもつ蛍光色素を用いることによりレーザーなど単一波長での励起による二つの波長での測光ができる。いままでの蛍光蛋白では同じ励起スペクトルをもつ蛋白がないためできなかったことで、これらの蛋白を用いることで励起のちがいによる測定のぶれという問題を解決できる。

(1 2) pH 感受性の測定

50mM の下記の緩衝液中で蛋白質 (Keima616 及び Keima570) の吸収スペクトルを測定した (図 4 3 及び 4 4)。

各 pH の緩衝液は次の通り、

pH4、5、5.5 : 酢酸バッファー

pH6 : リン酸バッファー

pH6.6 : MOPS バッファー

pH7、7.5、8 : HEPES バッファー

pH9、10 : グリシンバッファー

pH7.5~10 でピークの値は安定していた。(図4 3 及び図4 4)

実施例 9

(1) ストークスシフトの大きな単量体赤色蛍光蛋白質の作製

keim616 の 61 番目のロイシンをグルタミンに、93 番目のトレオニンに、124 番目のトレオニンをグルタミン酸に、189 番目のチロシンをアルギニンに、191 番目のチロシンをグルタミン酸に置き換えることにより超遠心分子量測定により分子量 30.1kDa の結果から、アミノ酸配列から予想されるおよそ 29kDa とほぼ一致することから単量体となった keima616 蛋白を獲得した。本改変蛍光蛋白質を cmkeima620 とした(図4 5) (アミノ酸配列を配列表の配列番号 4 5 に示し、塩基配列を配列番号 4 6 に示す)。440nm に励起のピークをもち、この励起によって蛍光スペクトルは 620nm にピークを持つ(図4 6)。ストークスシフトは 180nm と非常に大きな値である。従来の蛍光蛋白質に比べ励起波長域と蛍光波長域を大きくとることができ、蛍光測定時に効率よく測定できる。また、同時多色蛍光測定も可能である。同一励起波長をもつ蛍光色素を用いることによりレーザーなど単一波長での励起による二つの波長での測光ができる。いままでの蛍光蛋白では同じ励起スペクトルをもつ蛋白がないため出来なかったことで、これらの蛋白を用いることで励起のちがいによる測定のぶれという問題を解決できる。また、全体の分子量をおさえ且つ蛍光蛋白質自身の間で多量体形成による相互作用がないため、ラベル分子の性質変化を最小限にとどめることができる。

(2) ストークスシフトの大きな単量体赤色蛍光蛋白質の改良

cmkeim616 の 62 番目のフェニルアラニンをロイシンに置き換えることにより

cmkeima620 のフォールディング効率が上昇したものを得た。本改変蛍光蛋白質を mkeima620 とした（アミノ酸配列を配列表の配列番号 47 に示し、塩基配列を配列番号 48 に示す）。440nm に励起のピークをもち、この励起によって蛍光スペクトルは 620nm にピークを持つ。ストークスシフトは 180nm と非常に大きな値である。cmkeima620 よりも相対的な蛍光強度が高いため（図 46、47）、単量体でも keima616 と同様に十分使いやすくなっている。

実施例 10：ストークスシフトの大きな蛋白質を用いた一波長励起二波長測光型 蛍光相互相関分光法の測定系の開発

分子間相互作用を測定するための手法として、蛍光分子を利用した蛍光相互相関分光法(FCCS) がある。これは2つの蛍光分子をプローブとして用いることにより分子間相互作用をモニタリングできる。

現在用いられている2つの異なる蛍光分子を用いた2 波長励起FCCS 測定において相互相関の感度を下げる大きな要因として色収差による2 波長の測定領域の重なりがあげられる。Keima616とECFPのような一つの波長で励起できしかも蛍光が分離できる蛍光蛋白質の組み合わせを用いた一波長励起FCCS ではこれを回避する事ができるため、FCCS 測定の感度の上昇が期待される（図 48）。また、Fluorescence Resonance energy transfer(FRET)を回避できるため、FCCSでの測定が簡便化され、蛋白質間相互作用のFCCSによる検出に適している。従ってストークスシフトが大きい蛍光蛋白質であるkeima616を用いることによりFCCSによる蛋白質間相互作用の検出が簡便かつ強力なものになると思われる。

（1） Caspase-3の活性検出

（a）蛍光相互相関測定における装置

蛍光相互相関測定にはTCS SP2 SOBS (Leica) とFCCSシステムを用いた。EGFP-（スパーサー）DEVD-mRFP1には、458 nm Argon ion Laserと594 nm HeNe Laserを用いて2 波長励起を行なった。またECFPとKeima616の組み合わせの蛋白質には458nm

Argon Laserを用いた。受光用バンドパスフィルタはEGFP:500-550、mRFP1:607-683を、ECFP :470-500、keima616:535-585を用いた。

(b) 蛍光相互相関測定解析

Caspase-3 により切断されるアミノ酸配列DEVDをEGFPとmRFPの間、keima616とECFPの間に導入し (図 4 9)、リコンビナントEGFP-DEVDmRFP1(x2) (アミノ酸配列を配列表の配列番号 4 9 に示し、塩基配列を配列番号 5 0 に示す) 、ECFP-(スペーサー)DEVD-keima616 (アミノ酸配列を配列表の配列番号 5 1 に示し、塩基配列を配列番号 5 2 に示す)、keima616-(スペーサー)DEVD- ECFP (アミノ酸配列を配列表の配列番号 5 3 に示し、塩基配列を配列番号 5 4 に示す) を作製した。発現蛋白質はN末端にHis-tagがつくようにコンストラクトしたので発現蛋白質はNi-Agarose gel(QIAGEN)で精製した。精製方法は付属のプロトコールに準じた。次にそれらの蛋白質を用いて相関作用を解析した。

相互相関の定量的な評価は、relative amplitude という相互相関関数の振幅 ($G_{cross}(0)$) を自己相関関数の振幅 ($G_{lower}(0)$) で割算した値を用いた。EGFP-DEVD-mRFP1(x2) では、 $G_{cross}(0) / G_{lower}(0)$ は約 0.4 であった(図 5 1)。Caspase-3 の添加により $G_{cross}(0)$ の減少が観られた(図 5 0)。

ECFP と keima616 の組み合わせでは $G_{cross}(0) / G_{lower}(0)$ は 0.4 であった(図 5 1)。Caspase-3 の添加により $G_{cross}(0)$ の迅速な減少が見られた。 $G_{cross}(0)$ の減少は Caspase-3 添加により 蛍光相関が無くなっていることを示している。EGFP-DEVD-mRFP よりも ECFP と Keima616 を組み合わせた蛋白質がより短時間で相関が無くなっておりこれにより後者の組み合わせがより 蛍光相互相関法により簡便かつ迅速に蛋白質の相互作用を示すことが明らかになった。

(c) SDS-PAGEによる蛋白質間相互作用の解析

keima616-DEVD-ECFPをCaspase-3で反応させるとkeima616とECFPの大きさのバンドが確認出来た。これらの蛋白質はCaspase-3によってDEVDが切断されたことを

意味する(図5 2)。Native-PAGEにおいても同様に反応後に2つのバンドが確認され、それぞれがkeima616とECFPであることが同定され、蛍光検出でもCaspase-3の活性があることが検出できた(図5 2)。

(2) カルモジュリンとの相互作用

(a) 蛋白質の合成・発現

カルモジュリンにはECFPを、M13にはKeima616を繋いだ(図5 3)。ECFP-カルモジュリンのアミノ酸配列を配列番号5 5に示し、塩基配列を配列番号5 6に示す。また、M13-Keima616のアミノ酸配列を配列番号5 7に示し、塩基配列を配列番号5 8に示す。それらの融合蛋白質は大腸菌株(JM109-DE3)で発現させた。発現蛋白質はN末端にHis-tagがつくようにコンストラクトしたので発現蛋白質はNi-Agarose gel (QIAGEN)で精製した。精製方法は付属のプロトコールに準じた。次にそれらの蛋白質を用いて相関作用を解析した。

(b) 蛍光相互相関測定における装置

蛍光相互相関測定にはConfoCor2 (Carl Zeiss)とLSM510 version3.2を用いた。458 nm Argon ion Laserを用いた。受光用バンドパスフィルタはECFP:475-525、Keima616:LP610を用いた。

(c) 蛍光相互相関測定の解析

相互相関の定量的な評価は、relative amplitudeという相互相関関数の振幅($G_{cross}(0)$)を自己相関関数の振幅($G_{lower}(0)$)で割算した値を用いた。EGTAによりカルシウムイオンをキレートしたサンプルでは $G_{cross}(0)/G_{lower}(0)$ は約0.005であった(図5 4)。しかしカルシウムイオンの添加により $G_{cross}(0)$ の値の上昇が確認できた(図5 5)。この結果はカルシウム依存的な蛋白質の相互作用を検出したことを示している。これにより蛍光相互相関法により蛋白質間相互作用が迅速且つ簡便に測定できることが明らかになった。

産業上の利用可能性

本発明により、単量体で存在することができる新規な蛍光蛋白質（mKO）が提供されることになった。二量体の蛍光蛋白質KOによるH e L a細胞でのミトコンドリアラベルにおいて、ミトコンドリアが粒々にラベルされ、本来のミトコンドリア像は得られない。しかし、単量体の蛍光蛋白質mKOでミトコンドリアをラベルした場合には正常な細長いひも状のミトコンドリア像が得られ、ダイナミックなミトコンドリアの動きも観察される。このような単量体化による有効性がミトコンドリア分子のラベルにより確認された。

また本発明の蛍光蛋白質（keima616, keima570）は、赤色、橙色の蛍光を放ち、励起のピークが 440nm（青色）である。ストークスシフト（励起のピーク値と蛍光のピーク値の差）は従来の赤色蛍光蛋白質（DsRed、HcRed）では 20nm～30nm であるのに対し、本発明の赤色蛍光蛋白質が 176nm、橙色蛍光蛋白質が 130nm と非常に大きい。故に本発明の蛍光蛋白質は最大の励起で最大の蛍光を得ることができることを特徴とする。また、励起のピークが 440nm であるため、青緑蛍光蛋白質（CFP）や緑色蛍光蛋白質（GFP）との同時励起染色において両者の蛍光を非常に有効に取得することが可能である。さらに従来の赤色蛍光蛋白質の励起ピークが 560nm から 590nm であるのに対し、本発明の蛍光蛋白質は励起のピークが 440nm であるので、励起光を変えて従来の赤色蛍光蛋白質と同時に染色することも可能とした。

請求の範囲

1. 以下の (a) 又は (b) に示す蛍光蛋白質。

(a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と同等の蛍光特性を有し、かつ単量体で存在する蛋白質。

2. 以下の (a) 又は (b) に示す蛍光蛋白質。

(a) 配列番号 3、5、7 又は 9 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号 3、5、7 又は 9 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、それぞれ配列番号 3、5、7 又は 9 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質。

3. 以下の (a) 又は (b) に示す蛍光蛋白質。

(a) 配列番号 11、13、15、17、19、21、23、25、27 又は 29 に記載のアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質；

(b) 配列番号 11、13、15、17、19、21、23、25、27 又は 29 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、それぞれ配列番号 11、13、15、17、19、21、23、25、27 又は 29 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質。

4. 以下の (a) 又は (b) に示す蛍光蛋白質をコードする DNA。

(a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質

(b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と同等の蛍光特性を有し、かつ単量体で存在する蛋白質。

5. 以下の (a) 又は (b) に示す蛍光蛋白質をコードする DNA。

- (a) 配列番号 3、5、7 又は 9 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；
- (b) 配列番号 3、5、7 又は 9 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、それぞれ配列番号 3、5、7 又は 9 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質。

6. 以下の (a) 又は (b) に示す蛍光蛋白質をコードする DNA。

- (a) 配列番号 11、13、15、17、19、21、23、25、27 又は 29 に記載のアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質；
- (b) 配列番号 11、13、15、17、19、21、23、25、27 又は 29 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、それぞれ配列番号 11、13、15、17、19、21、23、25、27 又は 29 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質。

7. 以下の (a) 又は (b) に示す DNA。

- (a) 配列番号 2 に記載の塩基配列を有する DNA
- (b) 配列番号 2 に記載の塩基配列において、1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ配列番号 2 に記載の塩基配列がコードする蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質であって、単量体で存在する蛋白質をコードする塩基配列を有する DNA。

8. 以下の (a) 又は (b) に示す DNA。

- (a) 配列番号 4、6、8 又は 10 に記載の塩基配列を有する DNA
- (b) 配列番号 4、6、8 又は 10 に記載の塩基配列において、1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつそれぞれ配列番号 4、6、8 又は 10 に記載の塩基配列がコードする蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質。

9. 以下の (a) 又は (b) に示す DNA。

- (a) 配列番号 12、14、16、18、20、22、24、26、28 又は 30

0に記載の塩基配列を有するDNA。

(b) 配列番号12、14、16、18、20、22、24、26、28又は30に記載の塩基配列において、1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつそれぞれ12、14、16、18、20、22、24、26、28又は30に記載の塩基配列がコードする蛋白質と同等の蛍光特性を有する蛋白質。

10. 請求項4から9の何れかに記載のDNAを有する組み換えベクター。

11. 請求項4から9の何れかに記載のDNA又は請求項10に記載の組み換えベクターを有する形質転換体。

12. 請求項1から3の何れかに記載の蛍光蛋白質と他の蛋白質とから成る融合蛍光蛋白質。

13. 他の蛋白質が細胞内に局在する蛋白質である、請求項12に記載の融合蛋白質。

14. 他の蛋白質が細胞内小器官に特異的な蛋白質である、請求項12又は13に記載の融合蛋白質。

15. 他の蛋白質が蛍光蛋白質である、請求項12に記載の融合蛋白質。

16. 分子内FRETを生じる、請求項15に記載の融合蛋白質。

17. 請求項12から14の何れか1項に記載の融合蛋白質を細胞内で発現させることを特徴とする、細胞内における蛋白質の局在または動態を分析する方法。

18. 請求項1から3の何れかに記載の蛍光蛋白質、請求項4から9の何れかに記載のDNA、請求項10に記載の組み換えベクター、請求項11に記載の形質転換体、又は請求項12から16の何れか1項に記載の融合蛋白質を含む、蛍光試薬キット。

19. 以下の(a)又は(b)に示す色素蛋白質。

(a) 配列番号37に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号37に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、

置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、吸光特性を有する蛋白質。

20. 以下の(a)又は(b)に示す蛍光蛋白質。

(a) 配列番号39に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号39に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、蛍光特性を有する蛋白質。

21. 以下の(a)又は(b)に示す蛍光蛋白質。

(a) 配列番号41、43、45又は47に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号41、43、45又は47に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、蛍光特性を有し、かつ100nm以上のストークスシフトを有する蛋白質。

22. 以下の(a)又は(b)に示す色素蛋白質をコードするDNA。

(a) 配列番号37に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号37に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、吸光特性を有する蛋白質。

23. 以下の(a)又は(b)に示す蛍光蛋白質をコードするDNA。

(a) 配列番号39に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号39に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、蛍光特性を有する蛋白質。

24. 以下の(a)又は(b)に示す蛍光蛋白質をコードするDNA。

(a) 配列番号41、43、45又は47に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号41、43、45又は47に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、蛍光特性を有し、かつ100nm以上のストークスシフトを有する蛋白質。

25. 以下の(a)又は(b)に示すDNA。

(a) 配列番号38に記載の塩基配列を有するDNA；

(b) 配列番号38に記載の塩基配列において、1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ吸光特性を有する蛋白質をコード

する塩基配列を有するDNA。

26. 以下の(a)又は(b)に示すDNA。

(a) 配列番号40に記載の塩基配列を有するDNA；

(b) 配列番号40に記載の塩基配列において、1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ蛍光特性を有する蛋白質をコードする塩基配列を有するDNA。

27. 以下の(a)又は(b)に示すDNA。

(a) 配列番号42、44、46又は48に記載の塩基配列を有するDNA；

(b) 配列番号42、44、46又は48に記載の塩基配列において、1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ、蛍光特性を有し、100nm以上のストークスシフトを有する蛋白質をコードする塩基配列を有するDNA。

28. 請求項22から27の何れかに記載のDNAを有する組み換えベクター。

29. 請求項22から27の何れかに記載のDNA又は請求項28に記載の組み換えベクターを有する形質転換体。

30. 請求項19から21の何れかに記載の蛋白質と他の蛋白質とから成る融合蛋白質。

31. 他の蛋白質が細胞内に局在する蛋白質である、請求項30に記載の融合蛋白質。

32. 他の蛋白質が細胞内小器官に特異的な蛋白質である、請求項30又は31に記載の融合蛋白質。

33. 他の蛋白質が蛍光蛋白質である、請求項30に記載の融合蛋白質。

34. 分子内FRETを生じる、請求項33に記載の融合蛋白質。

35. 請求項30から32の何れか1項に記載の融合蛋白質を細胞内で発現させることを特徴とする、細胞内における蛋白質の局在または動態を分析する方法。

36. 請求項19から21の何れかに記載の蛍光蛋白質、請求項22から27の何れかに記載のDNA、請求項28に記載の組み換えベクター、請求項29に記載の形質転換体、又は請求項30から34の何れか1項に記載の融合蛋白質を含む、試薬キット。

図 1

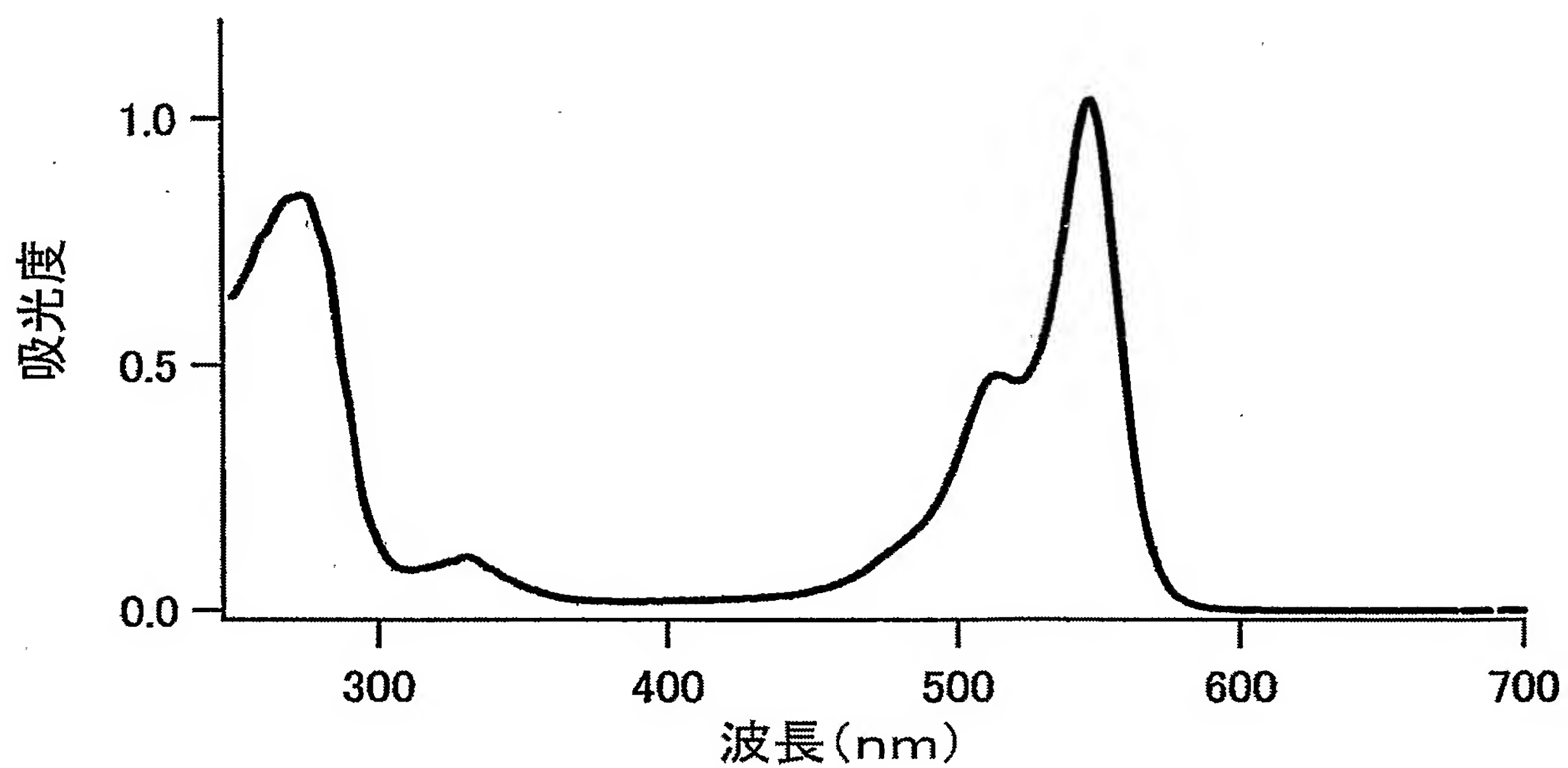


図 2

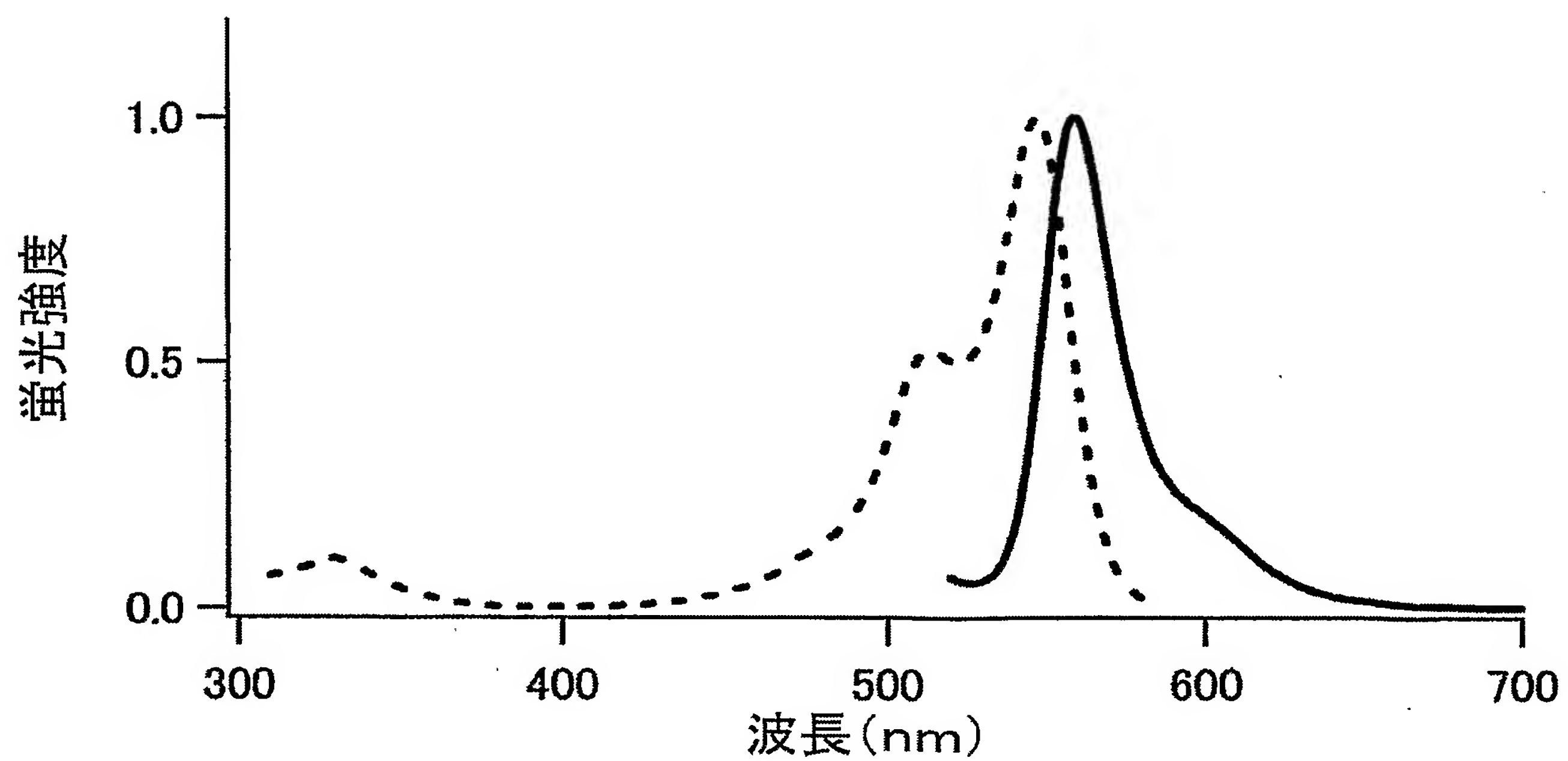


図 3

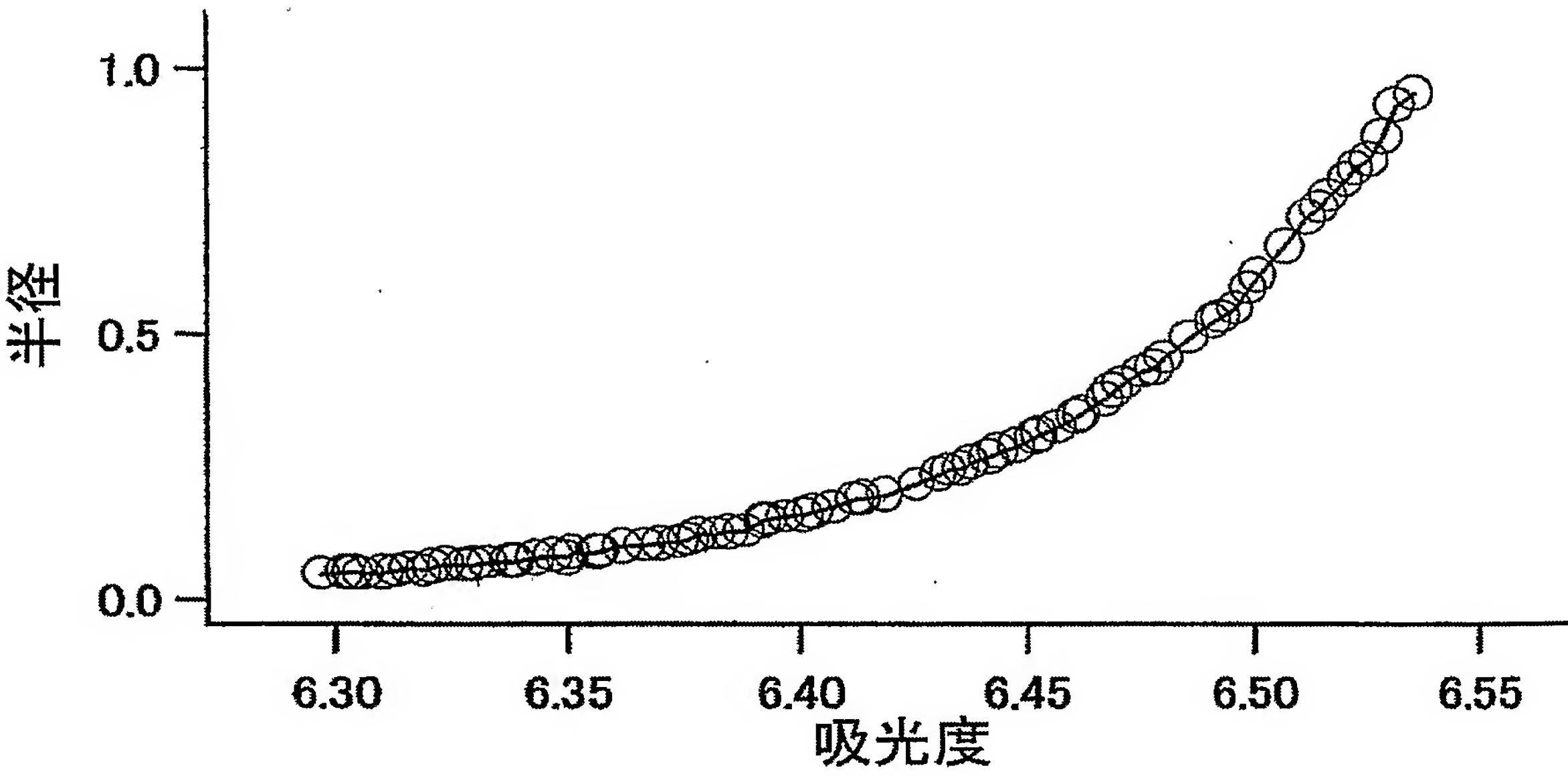


図 4

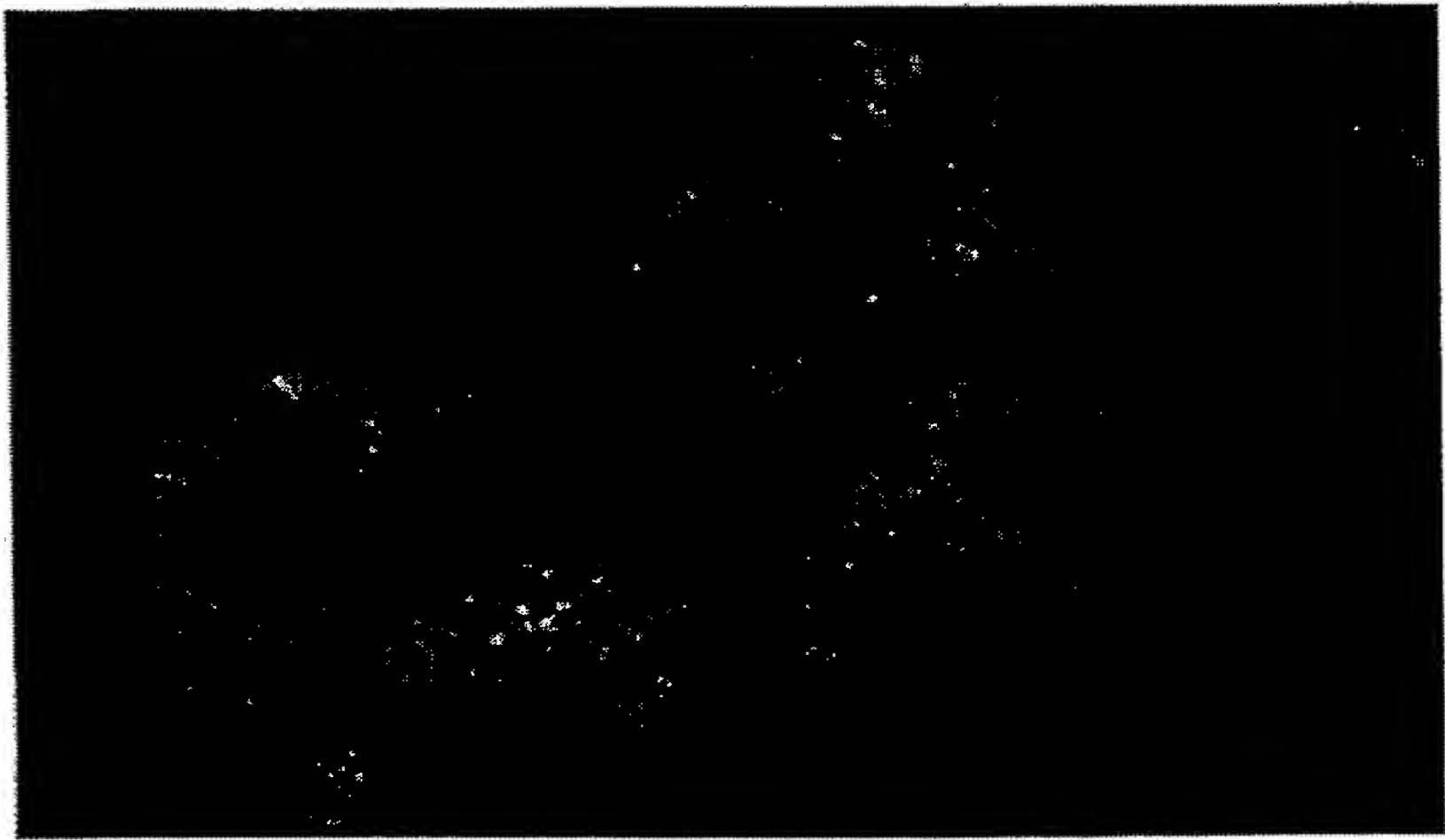


図 5



図 6

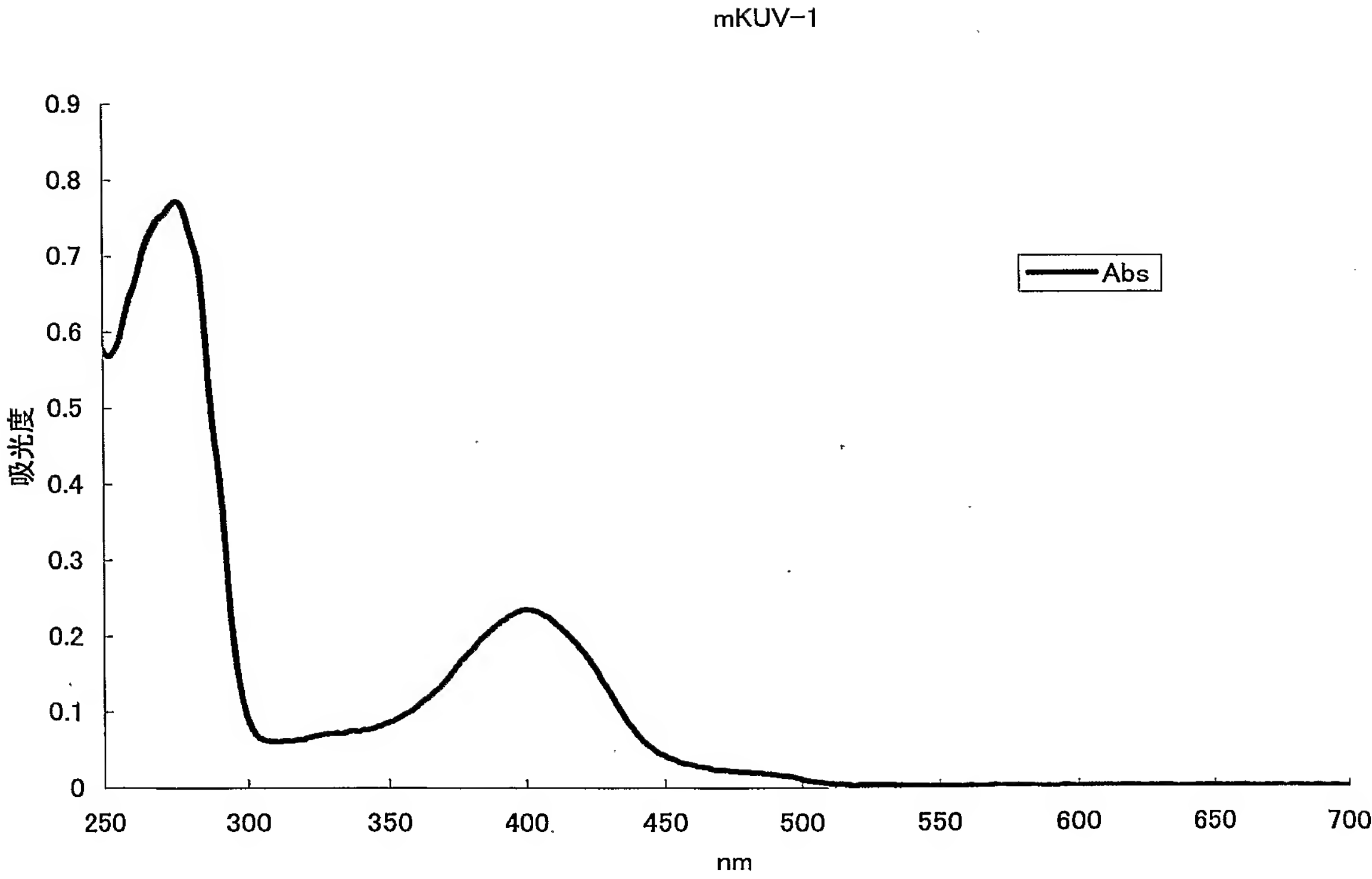


図 7

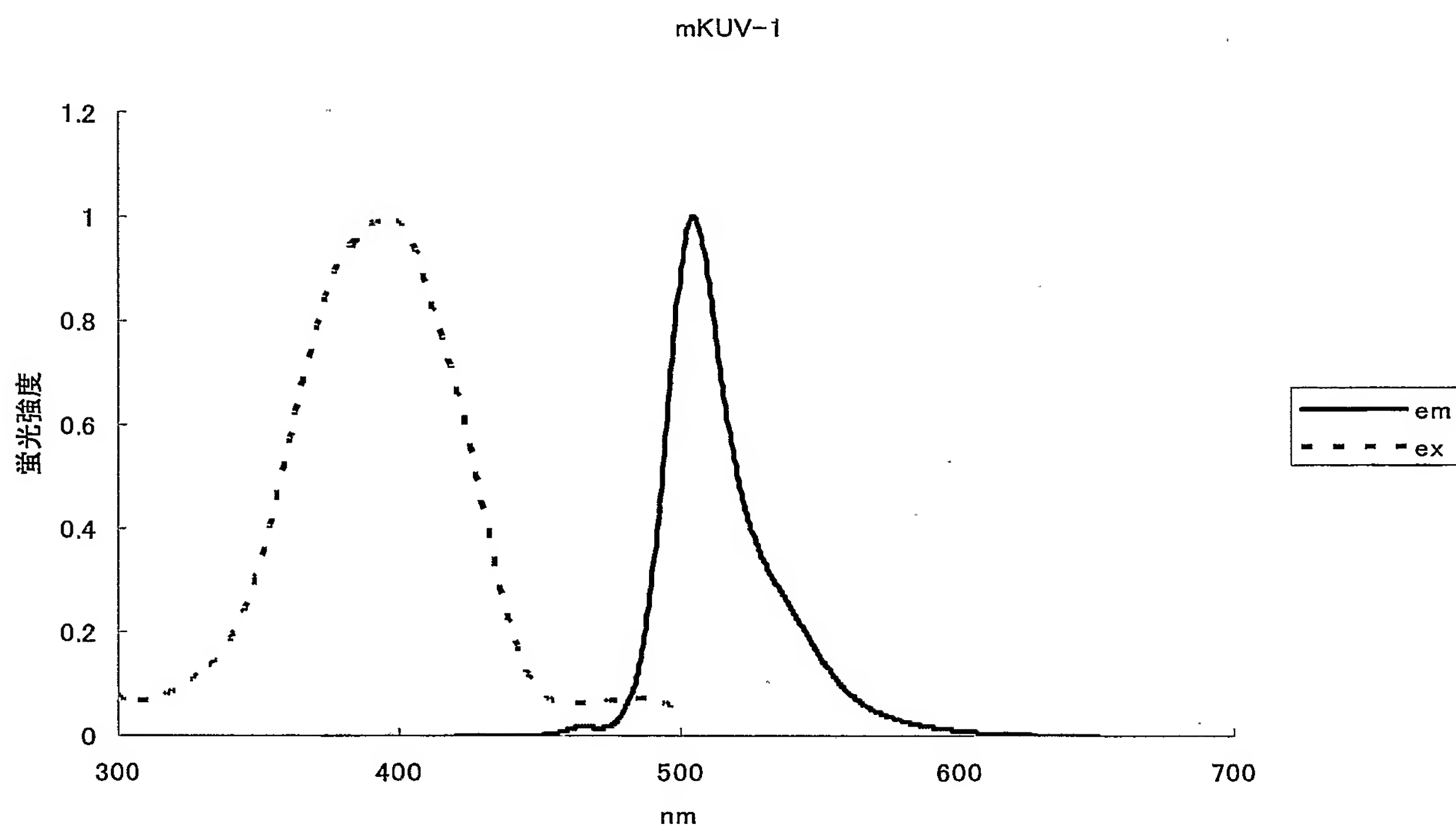


図 8

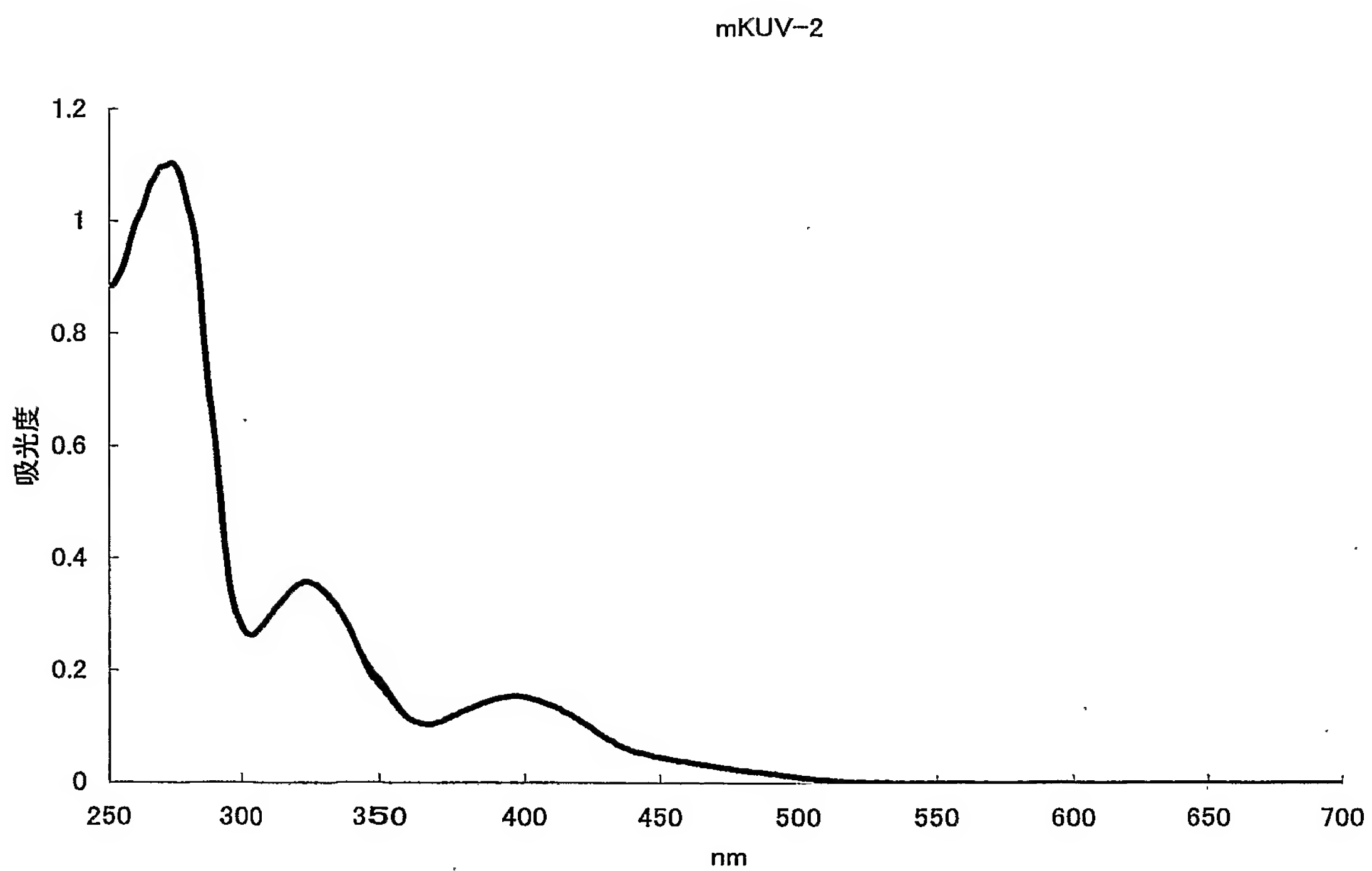


図 9

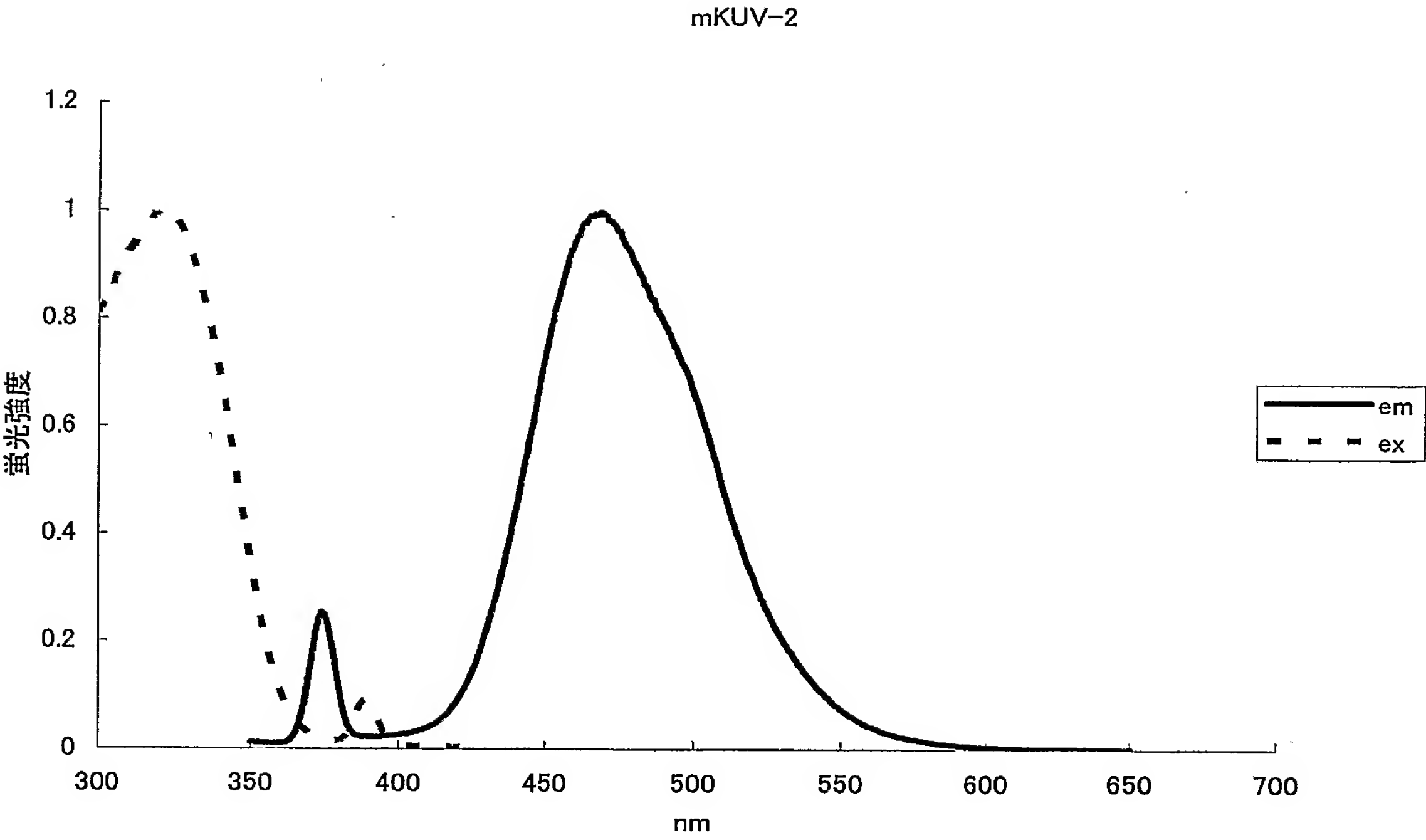


図 10

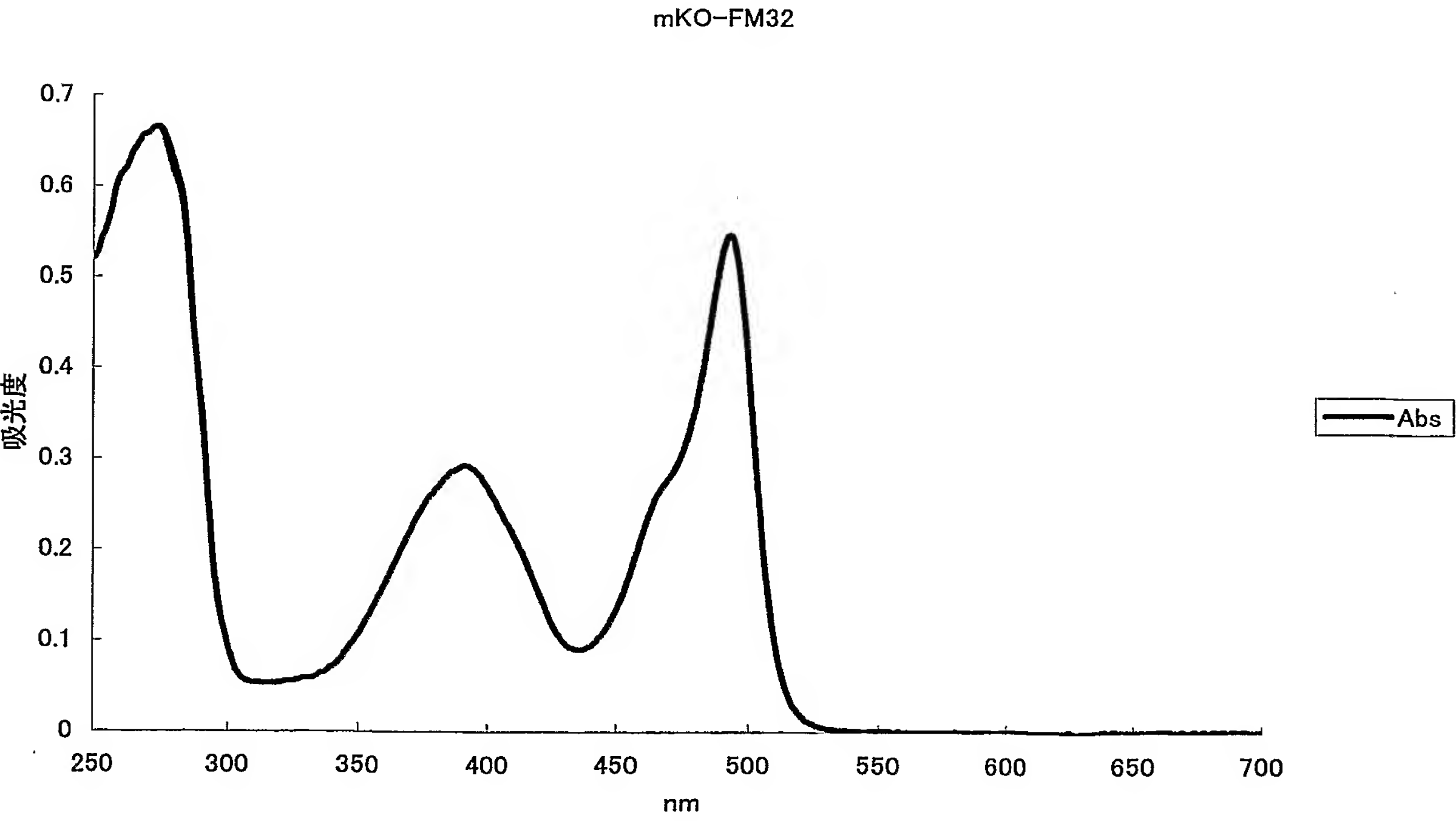


図 1 1

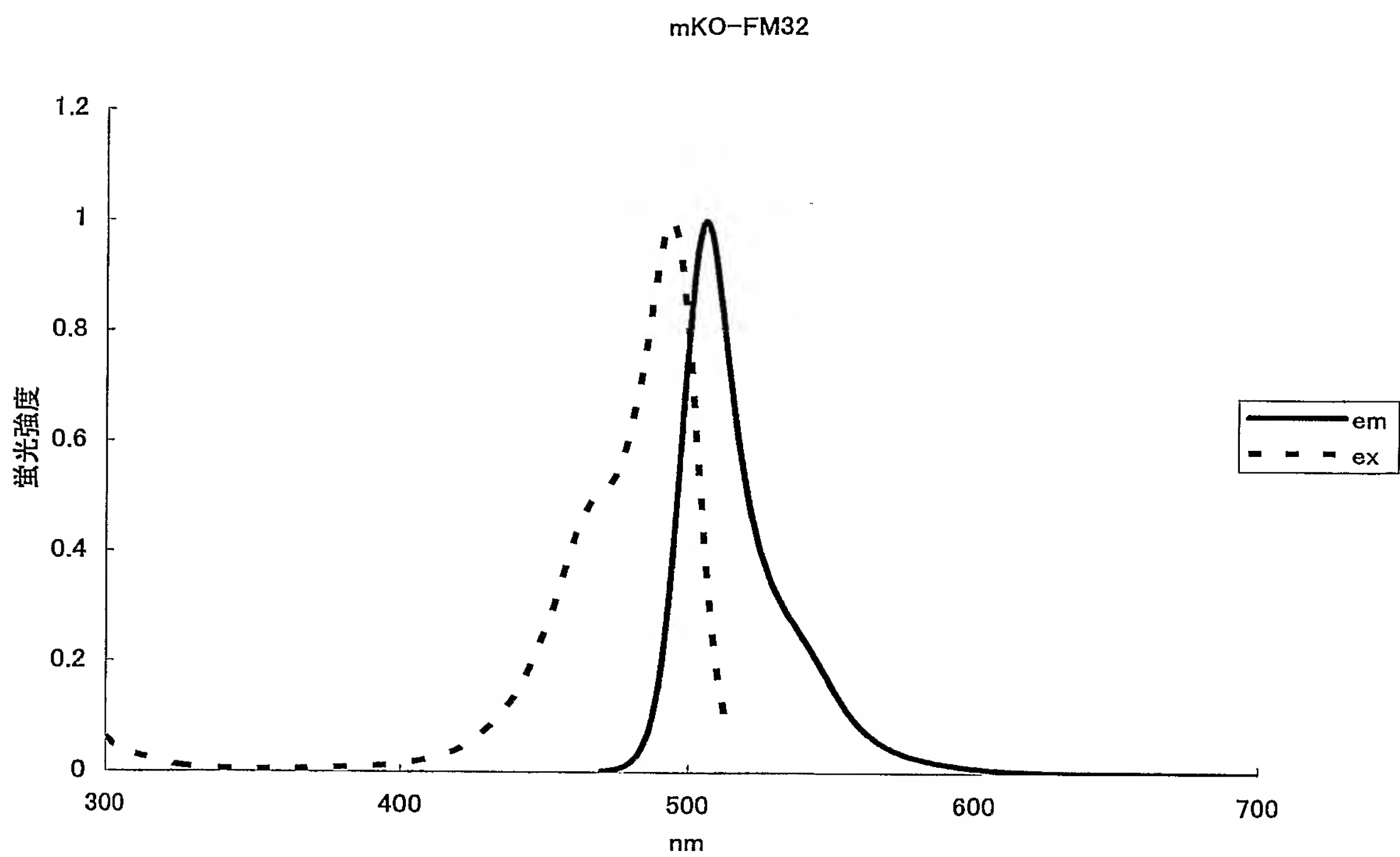


図 1 2

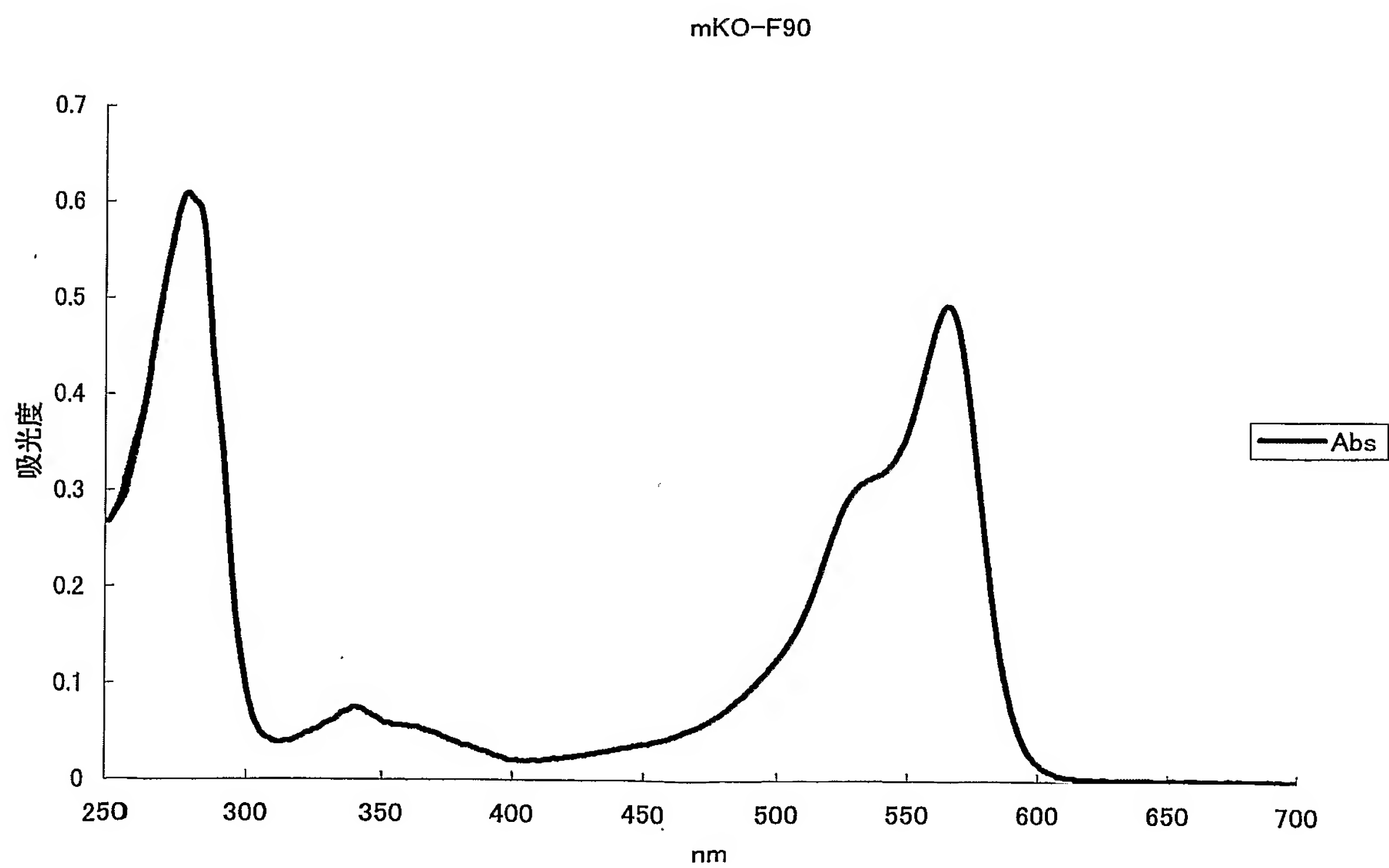


図 1 3

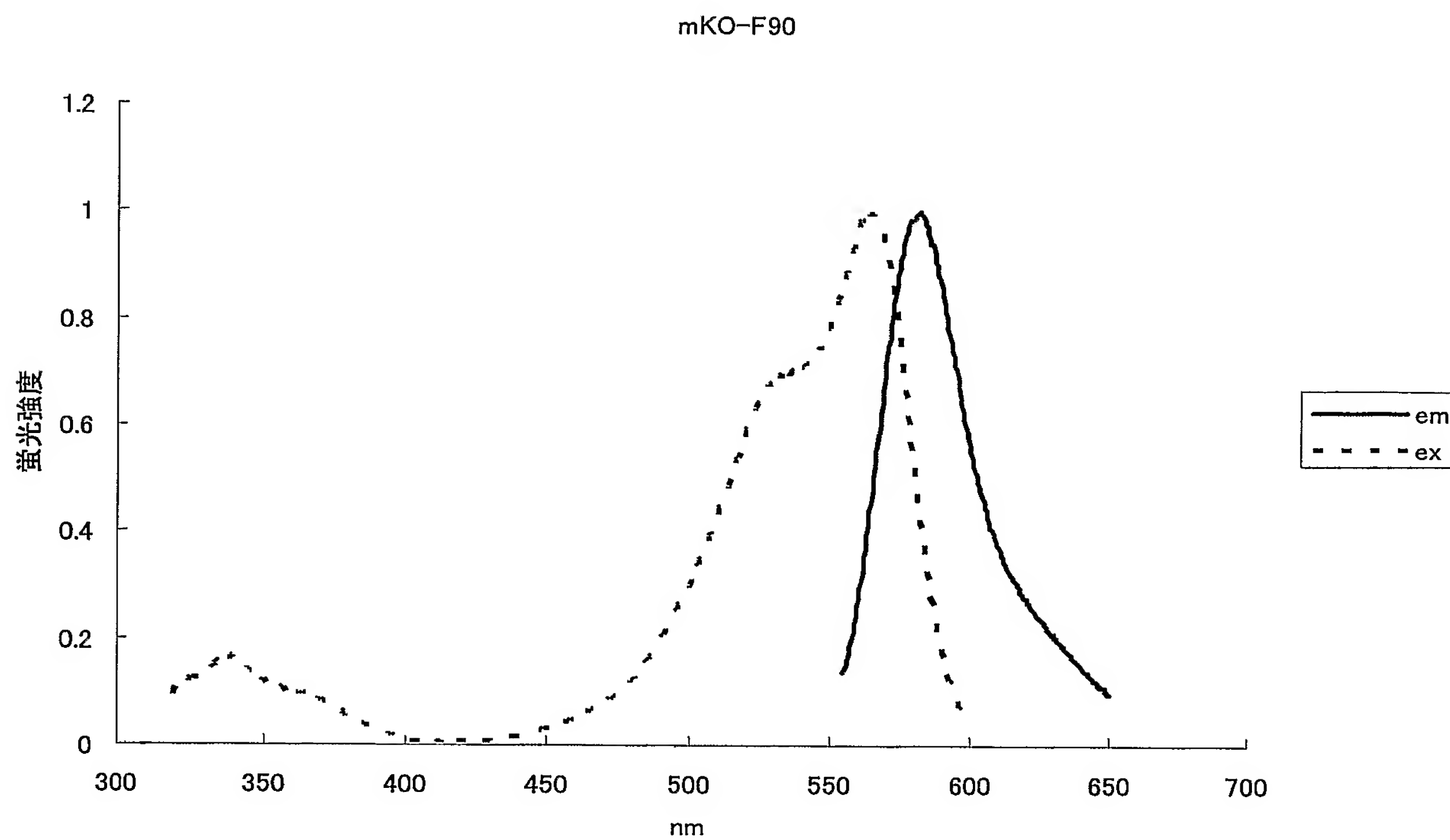


図 1 4

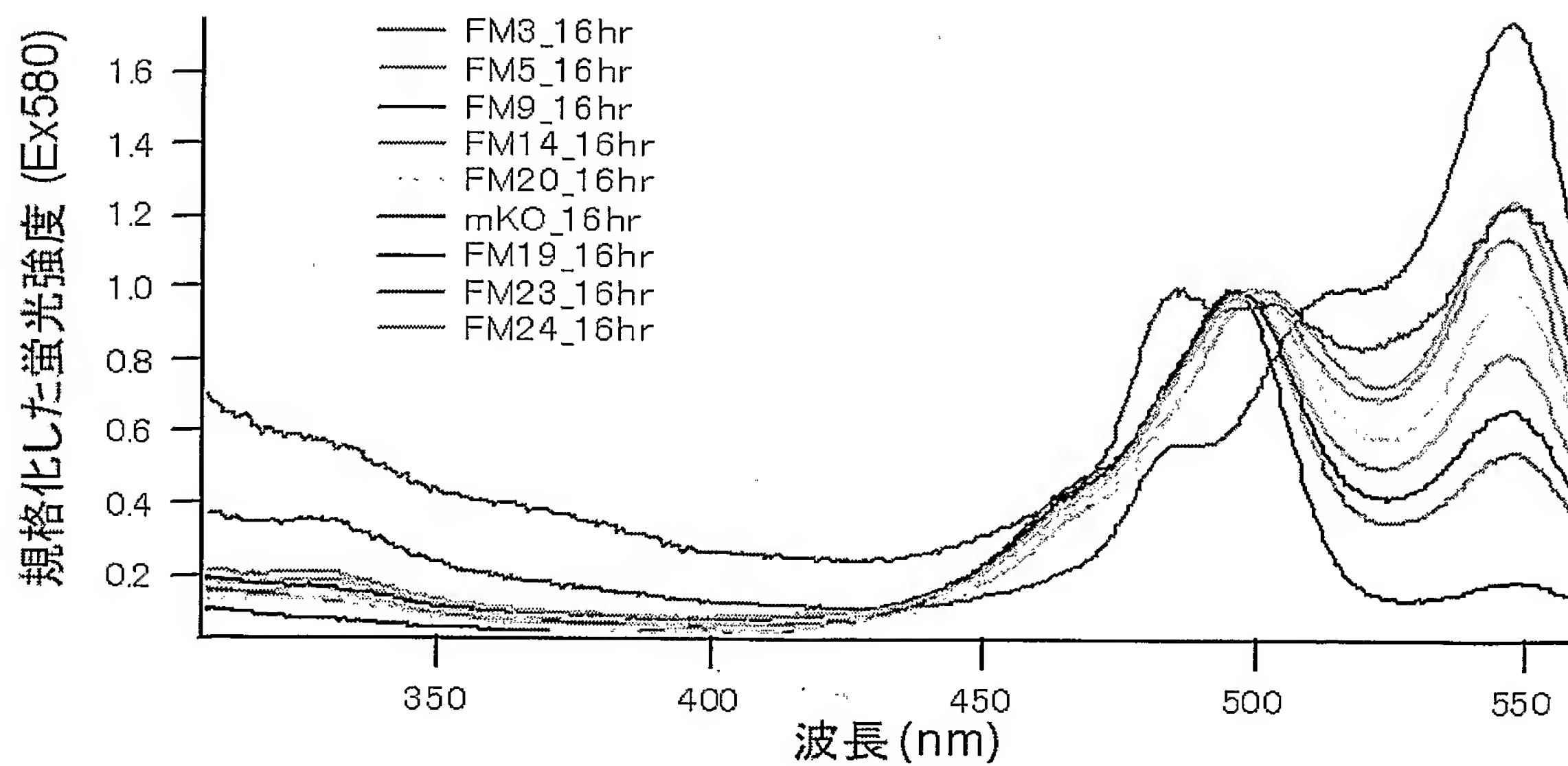


図 1 5

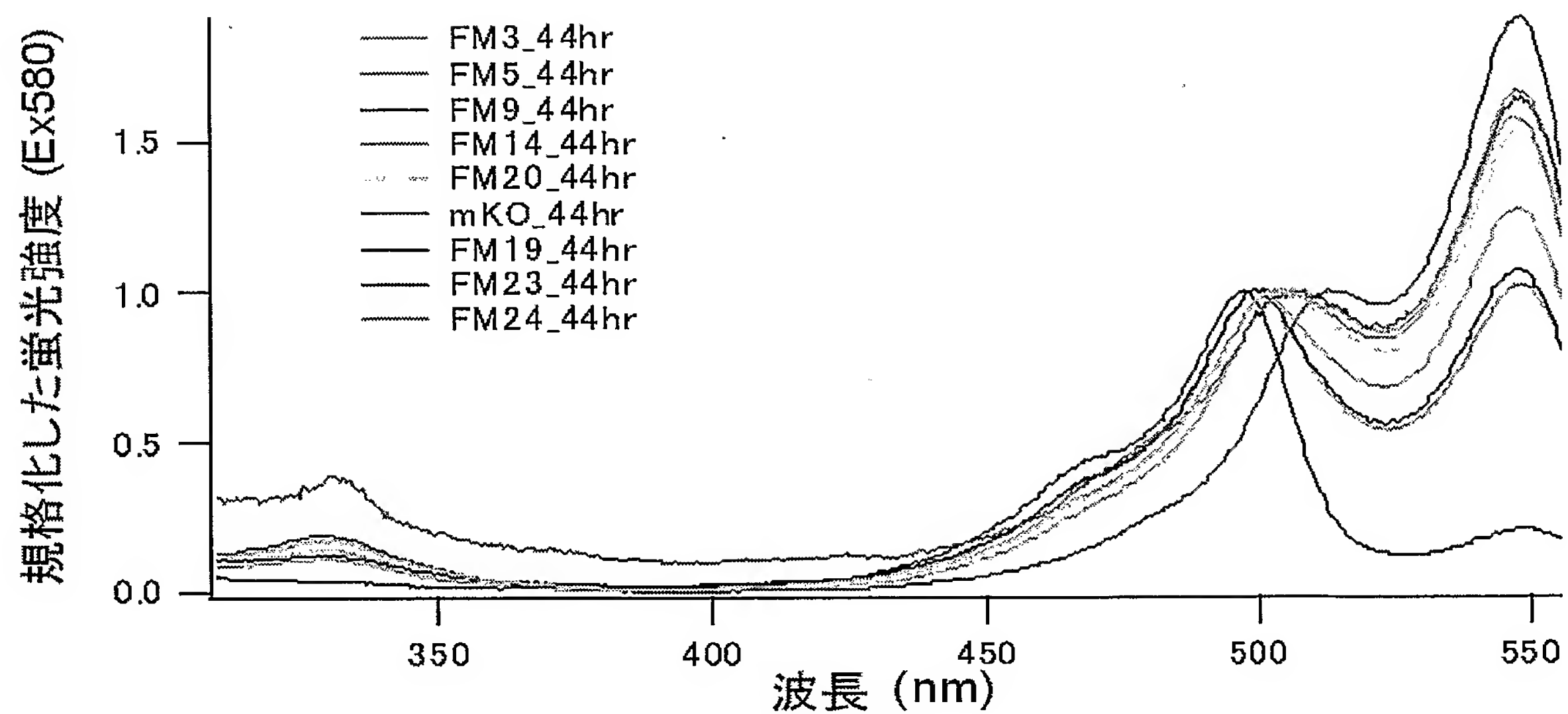


図 1 6

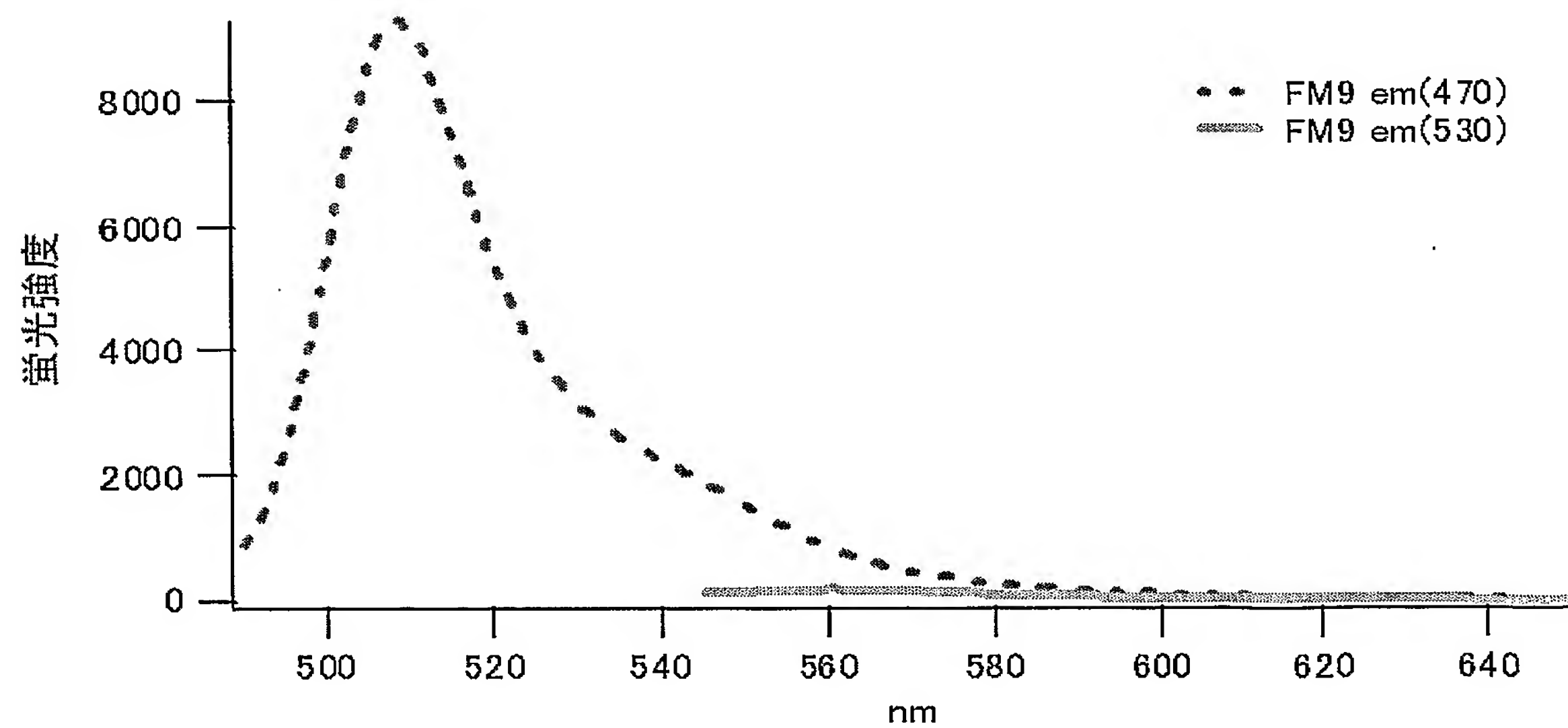


図 1 7

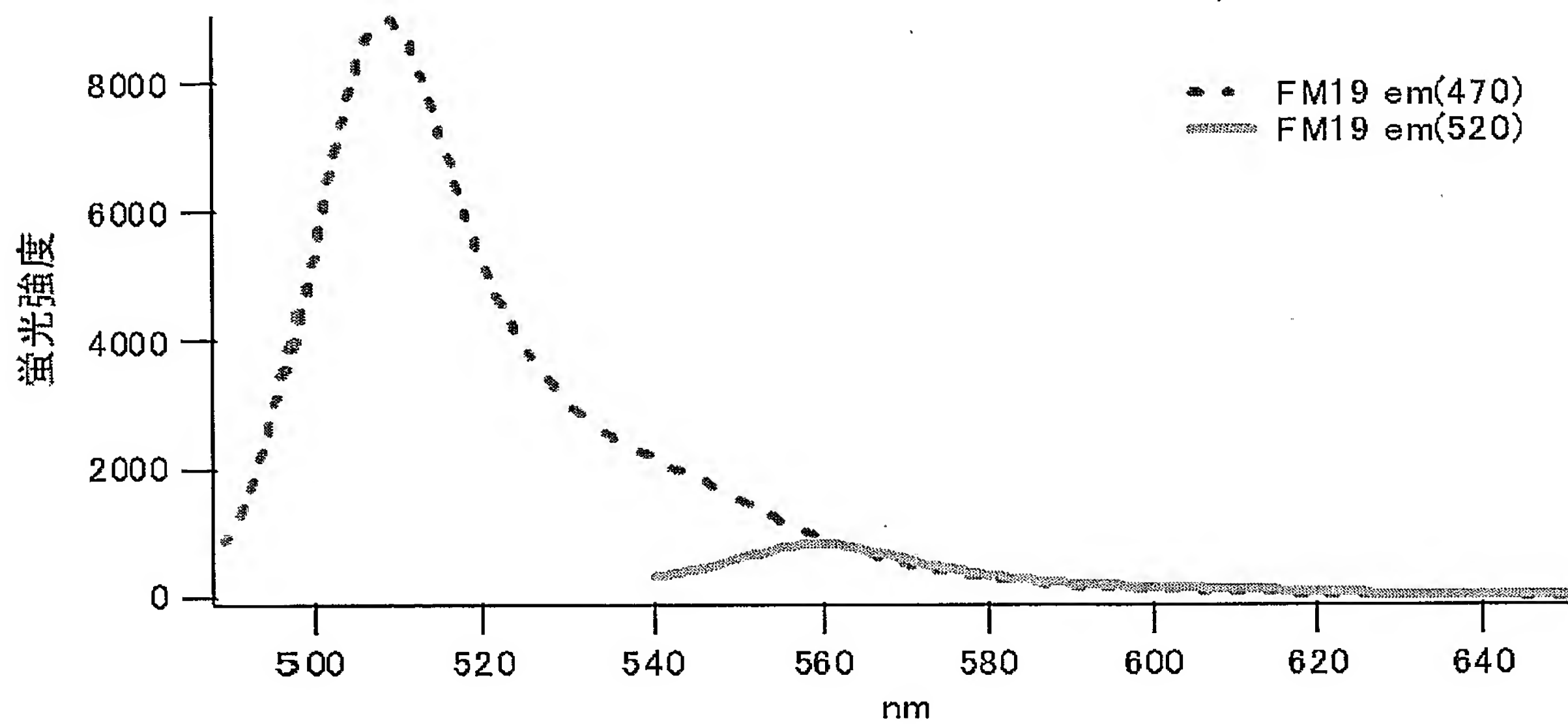


図 1 8

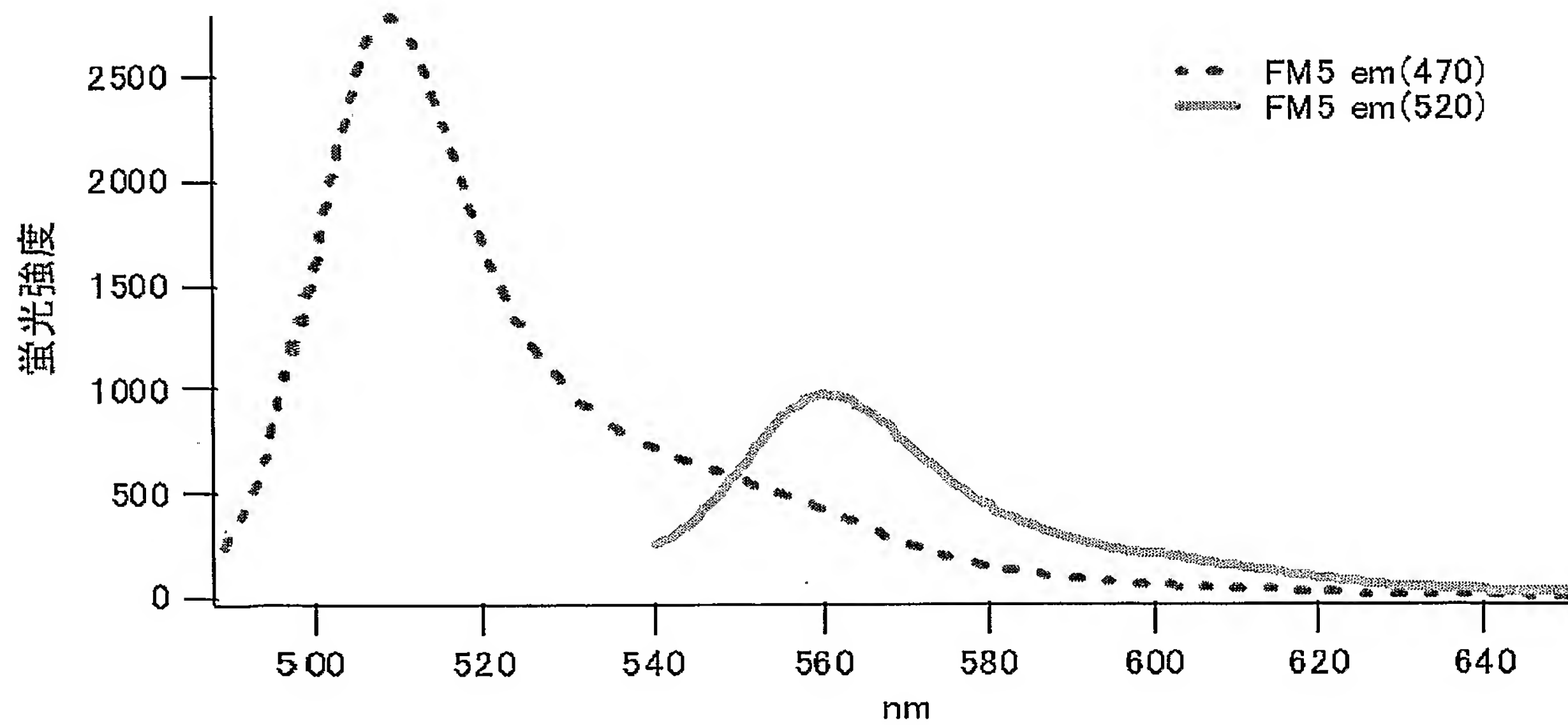


図 19

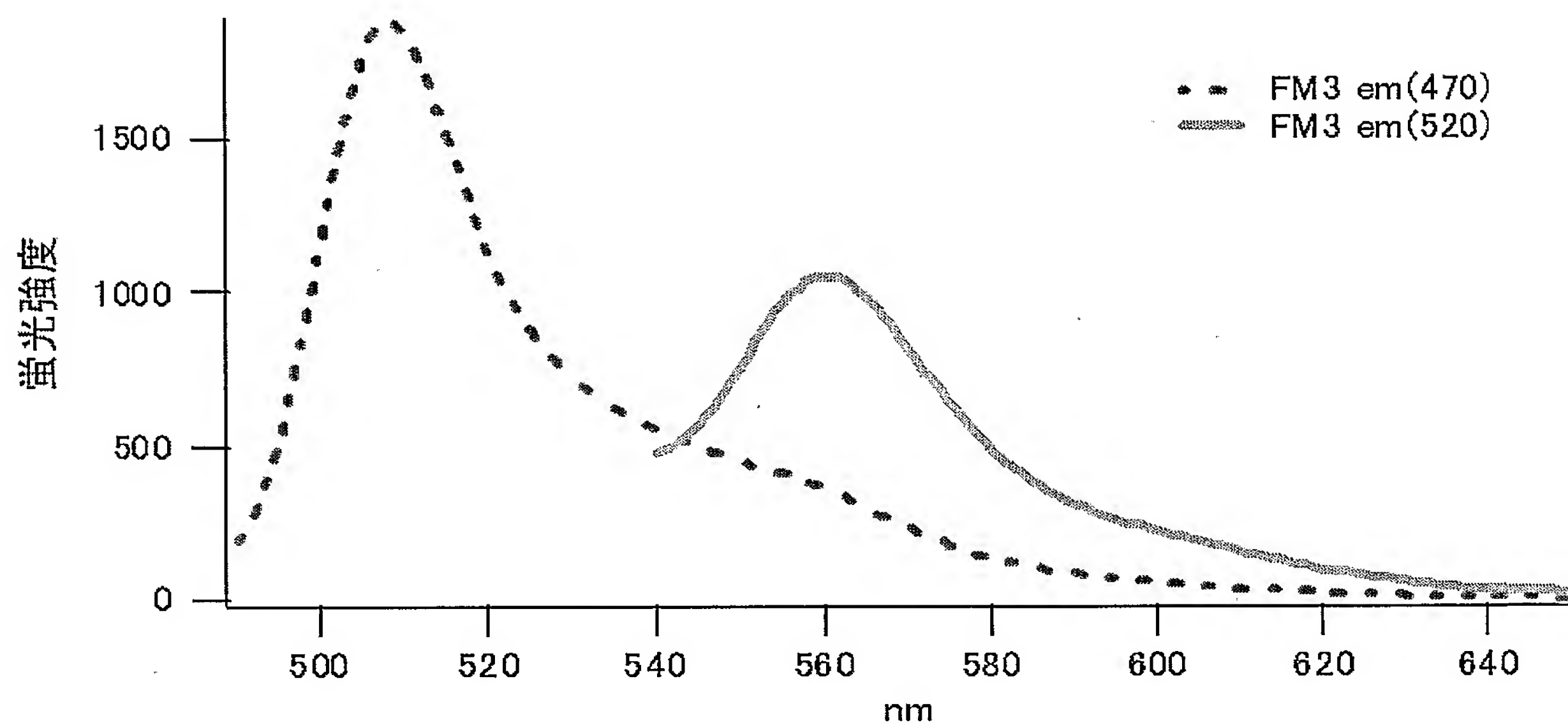


図 20

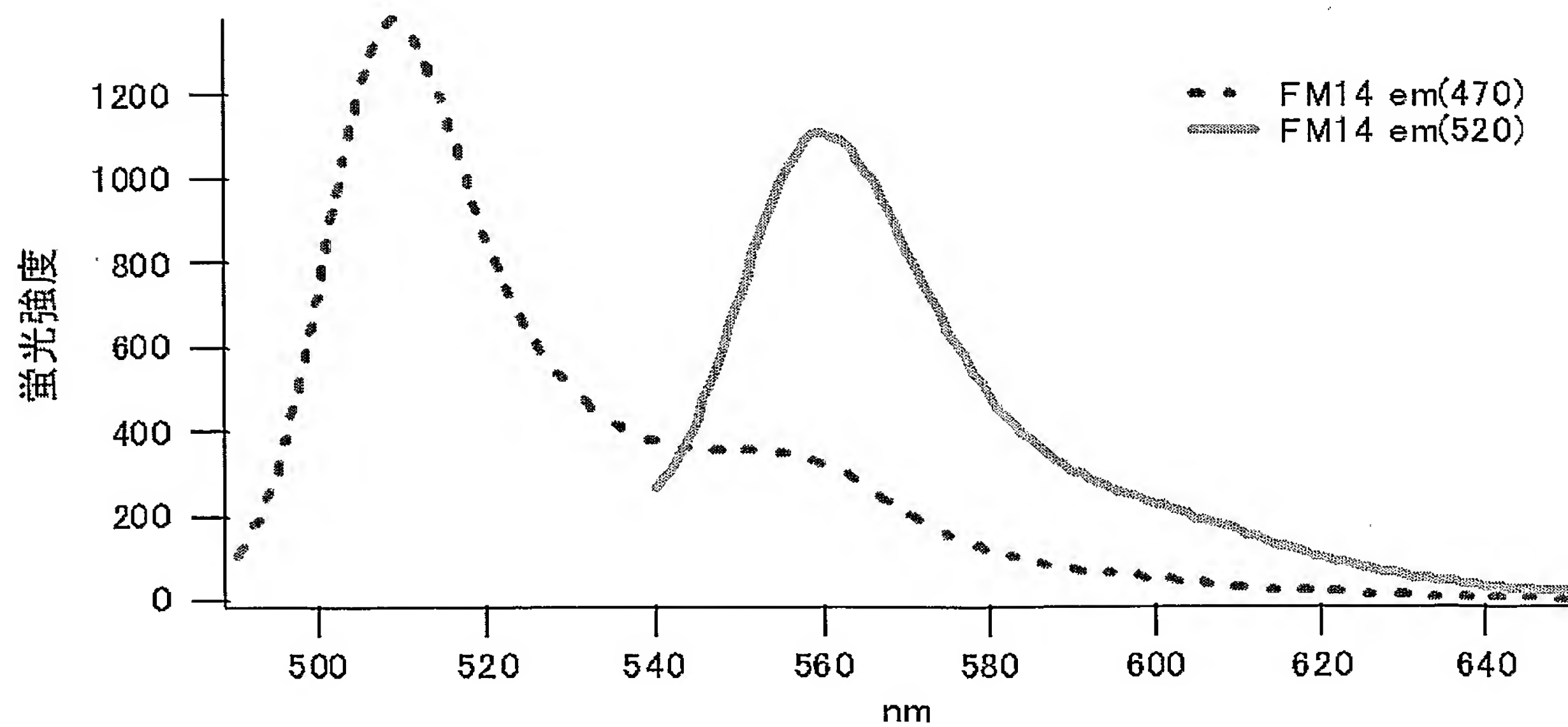


図 2 1

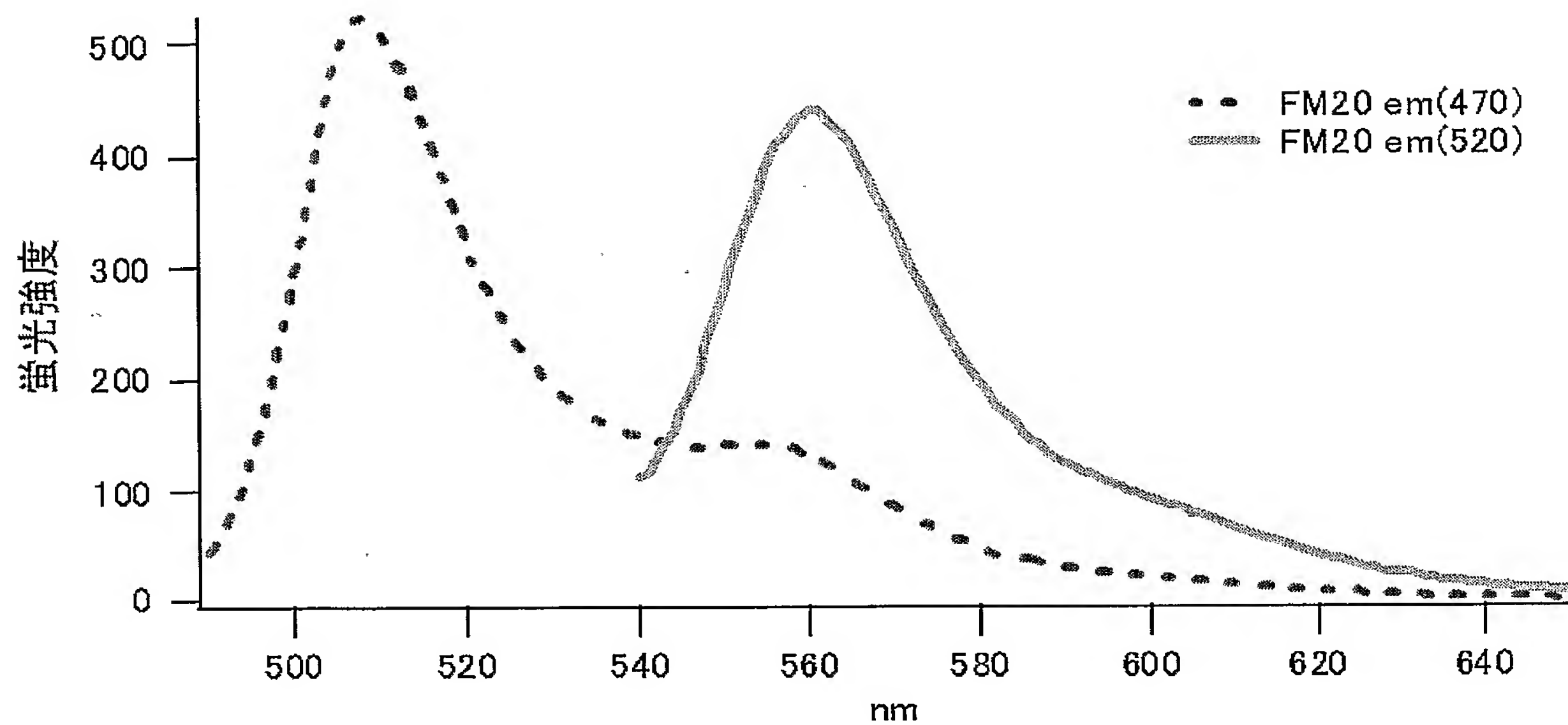


図 2 2

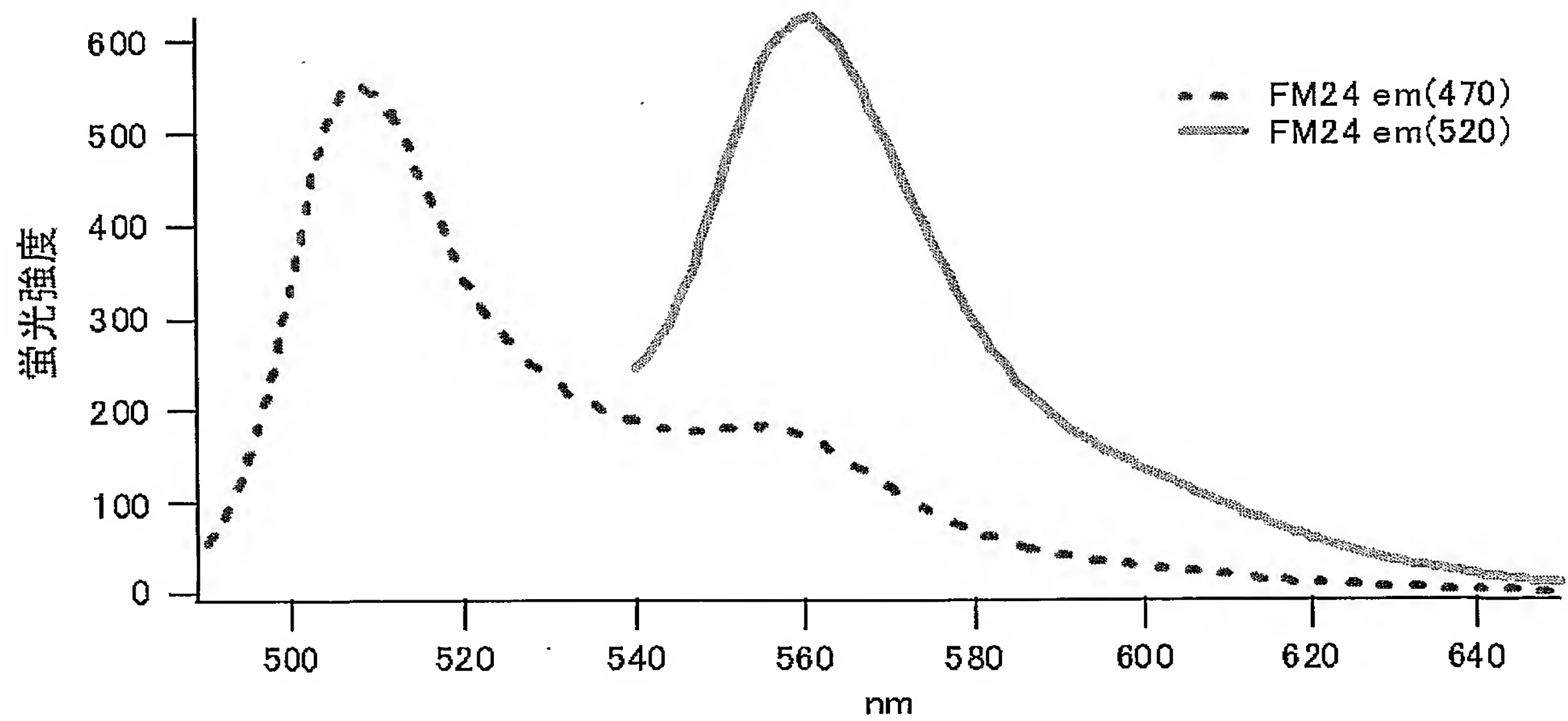


図 2 3

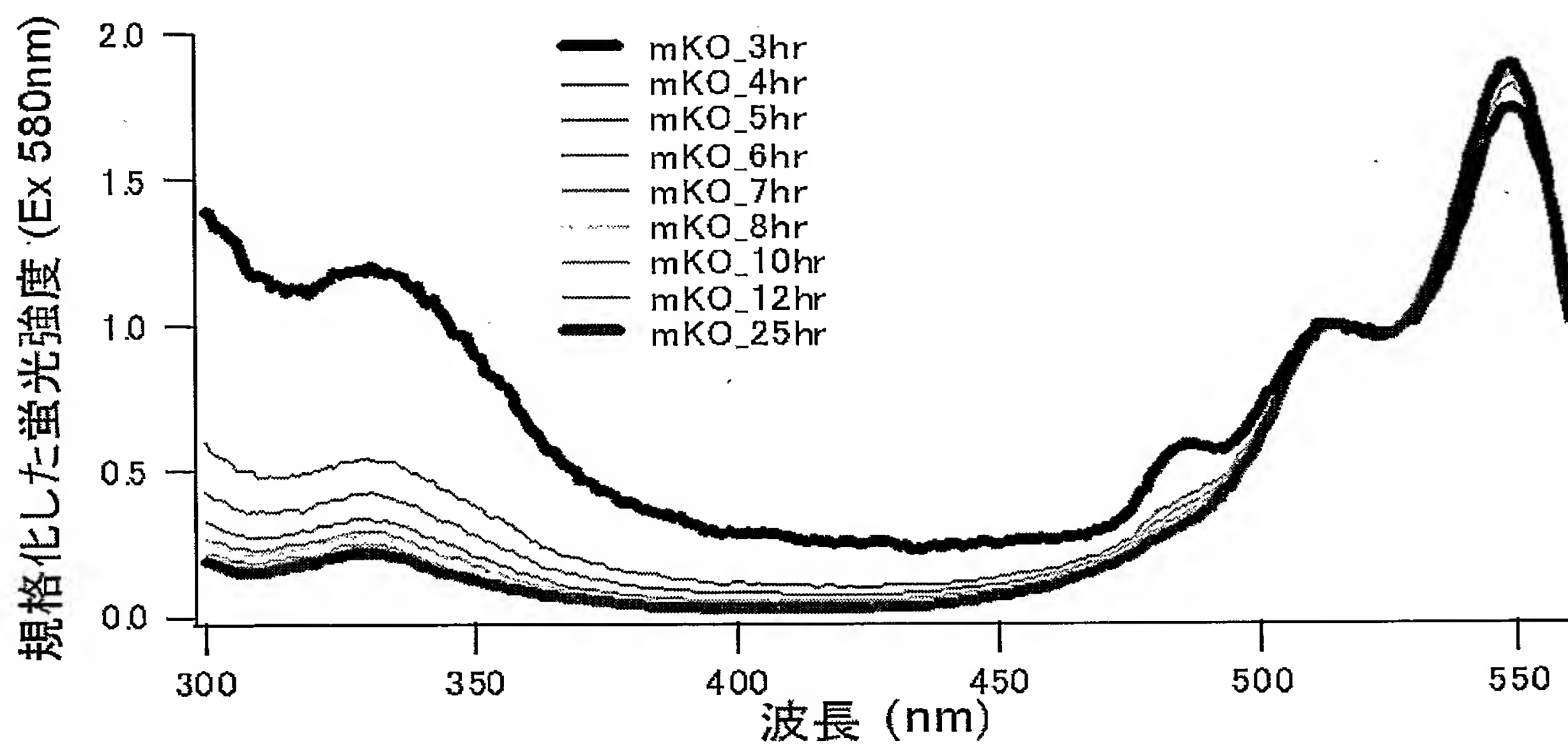


図 2 4

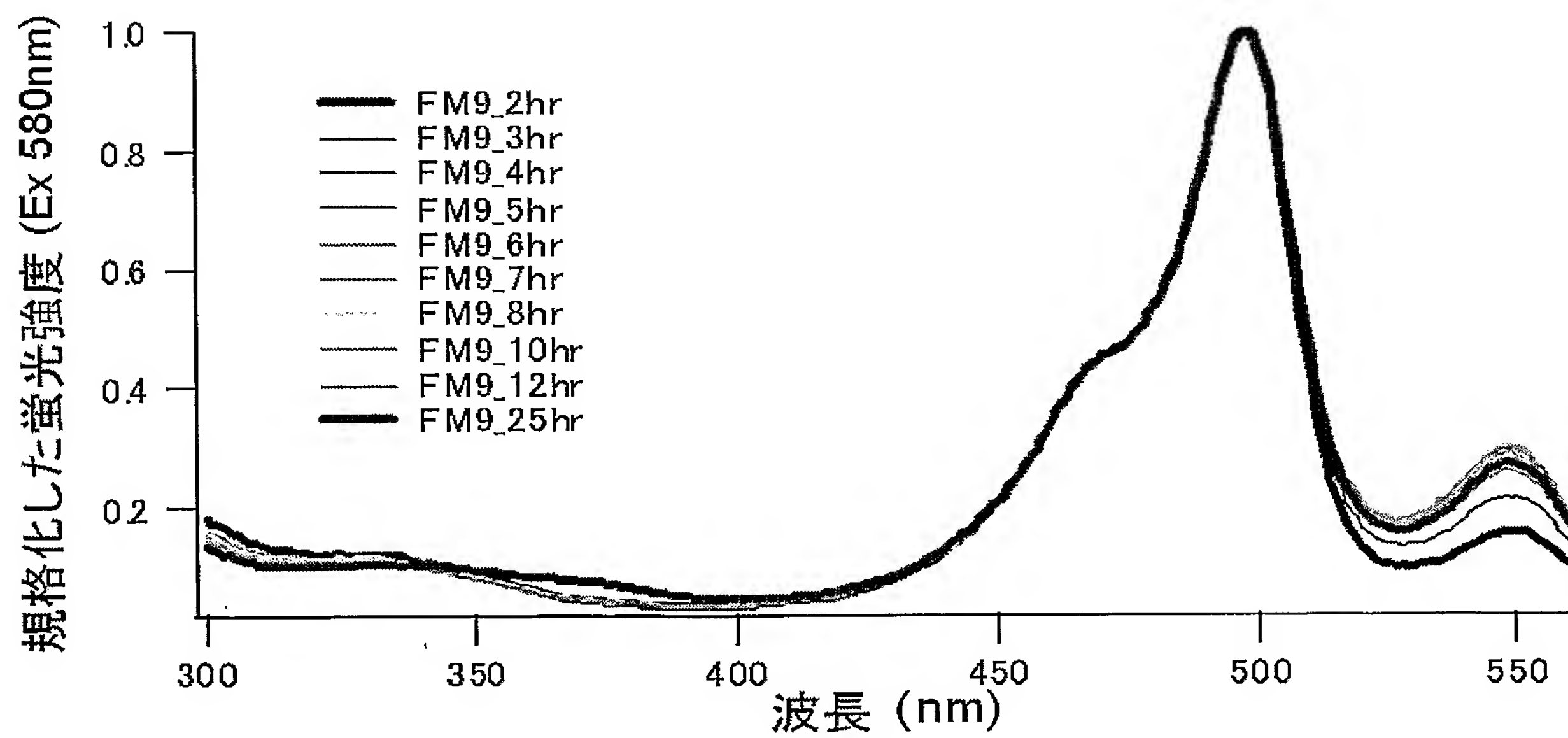


図 2 5

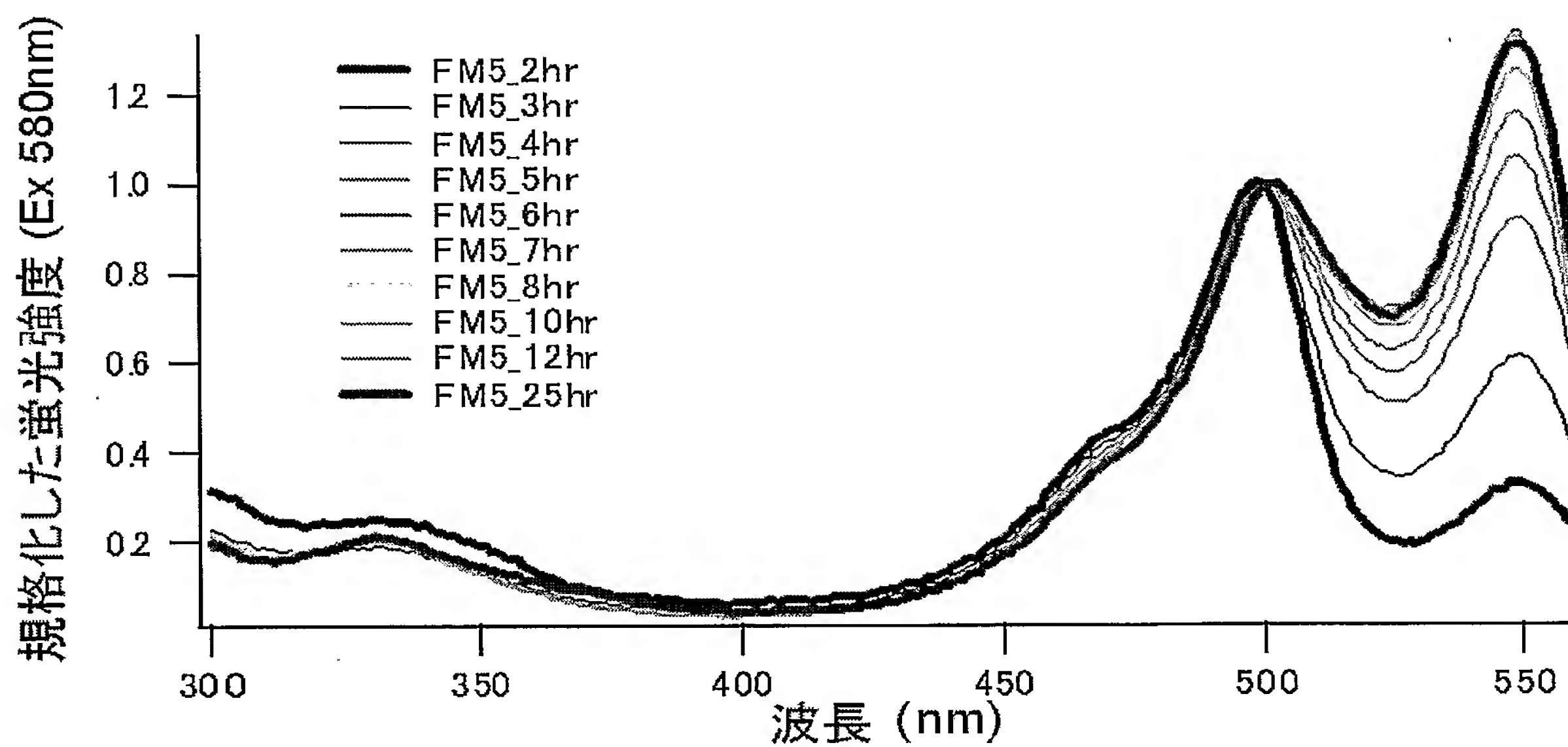


図 2 6

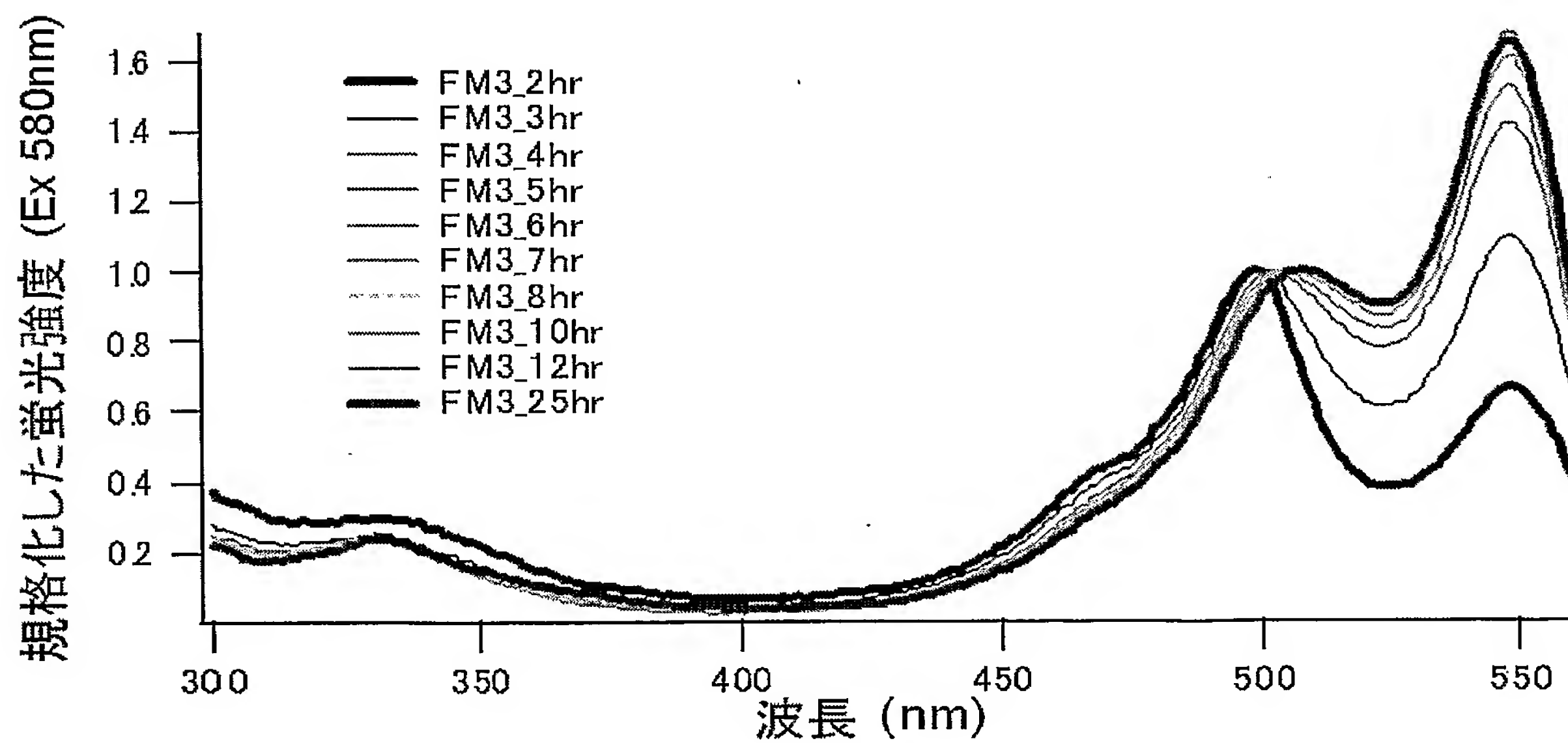


図 2 7

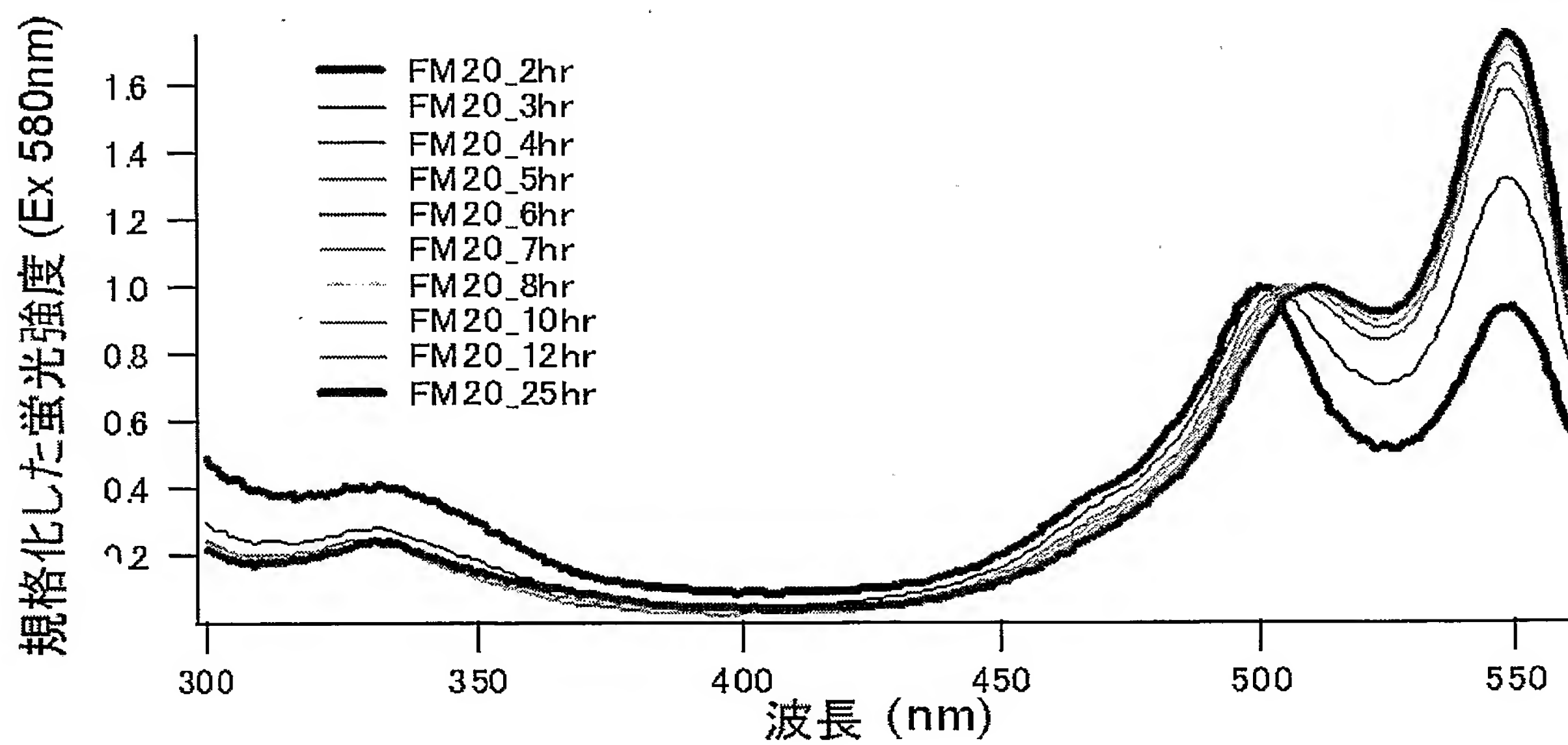


図 2 8

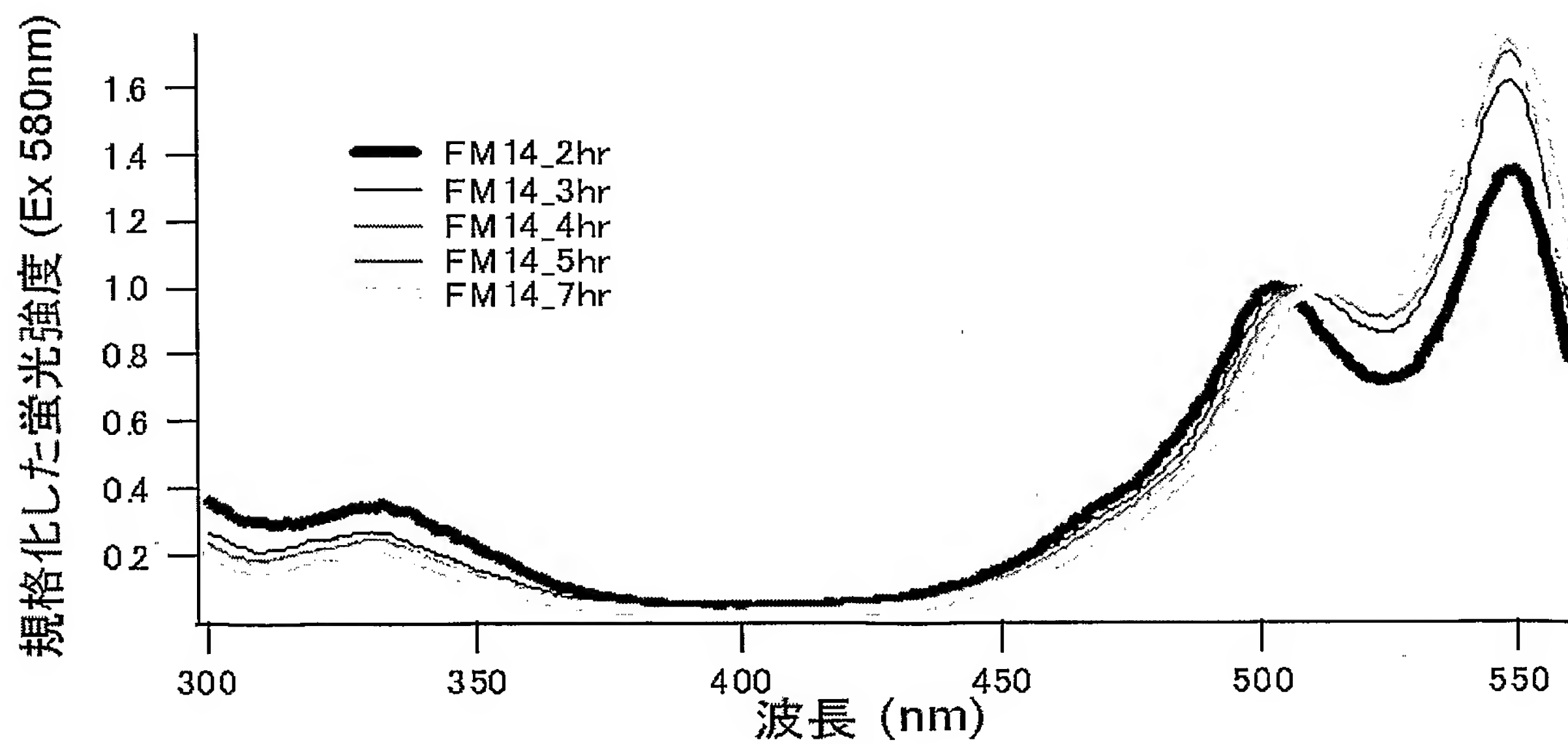


図 2 9

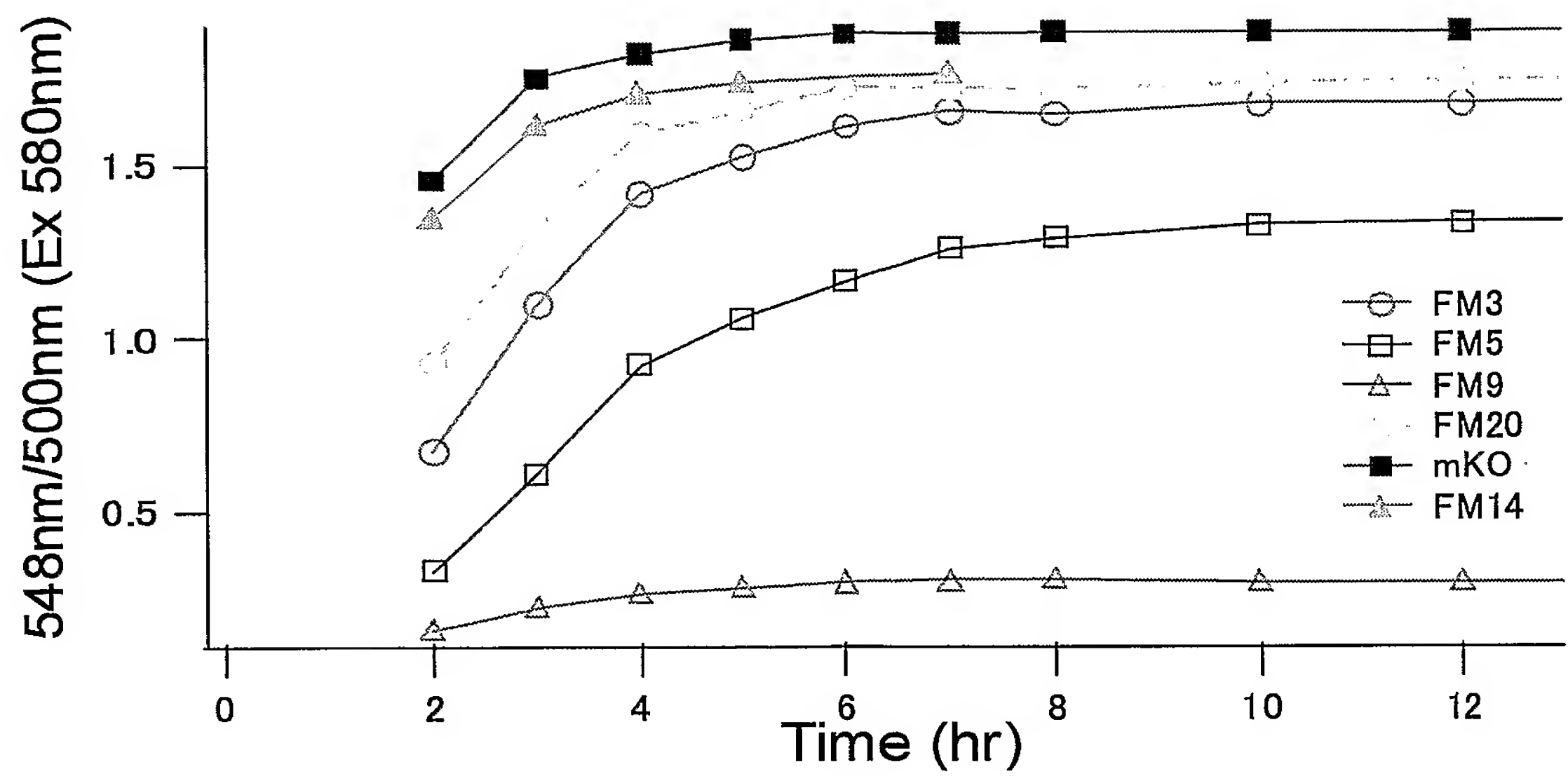


図 3 0

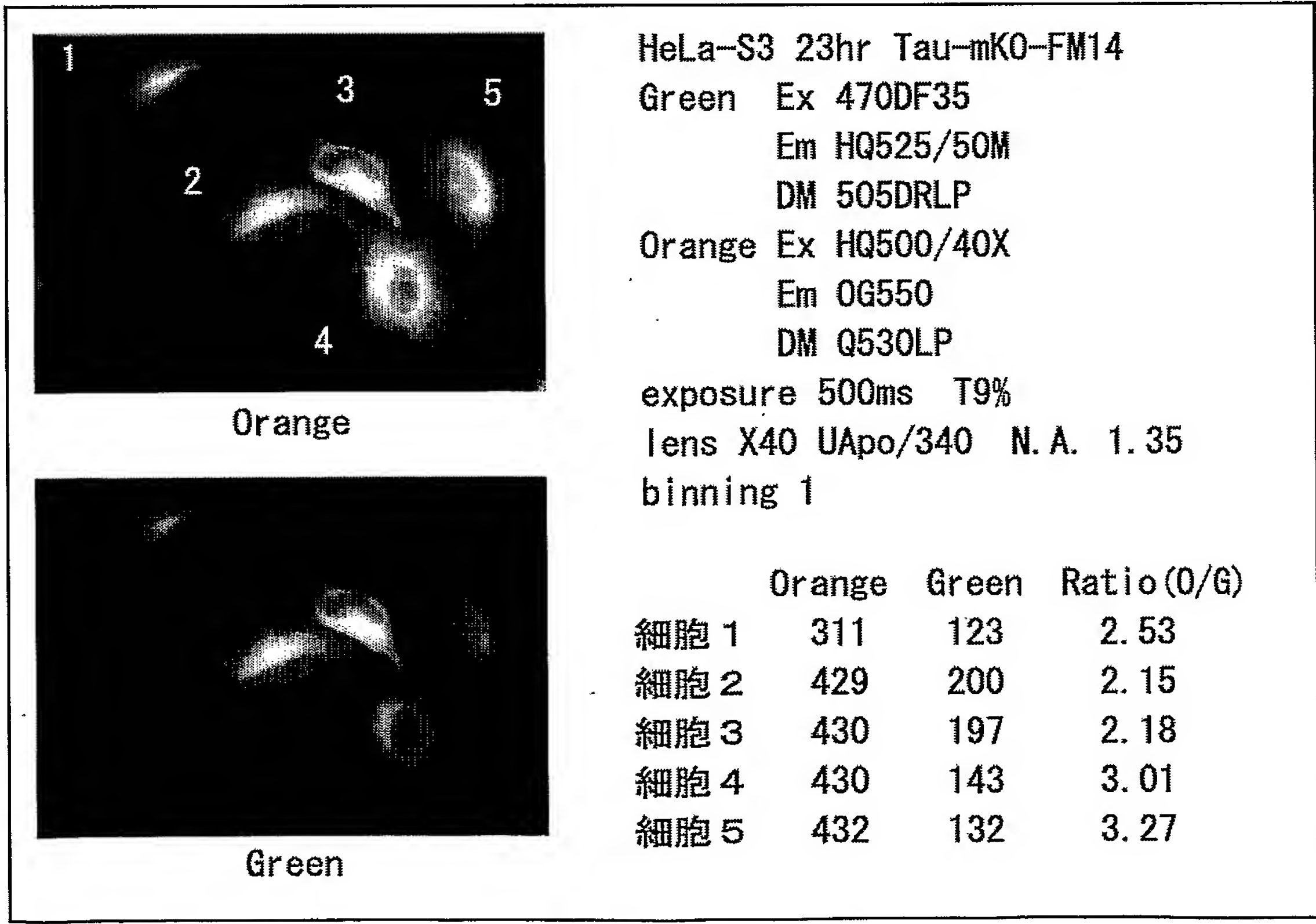


図 3 1

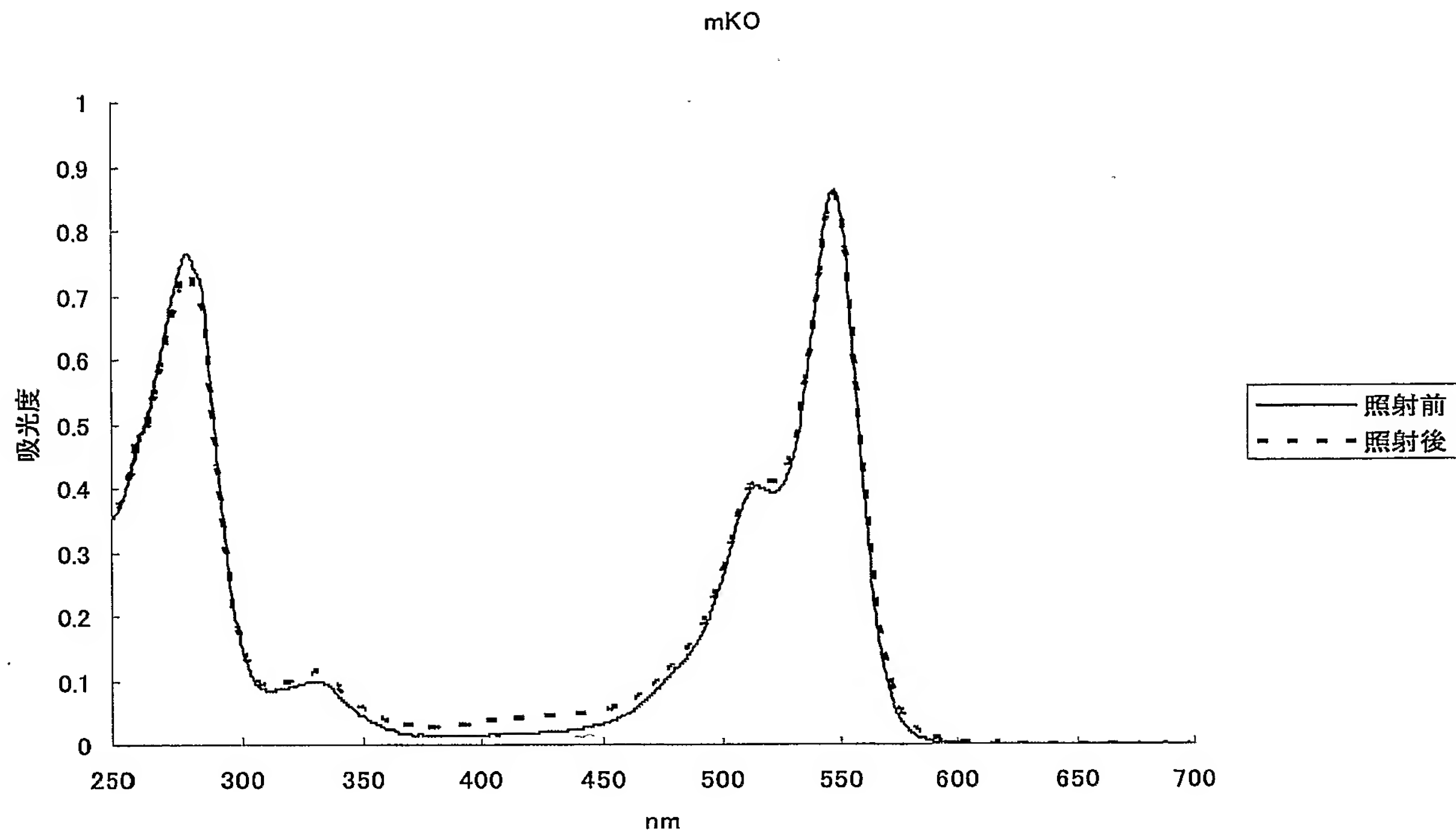


図 3 2

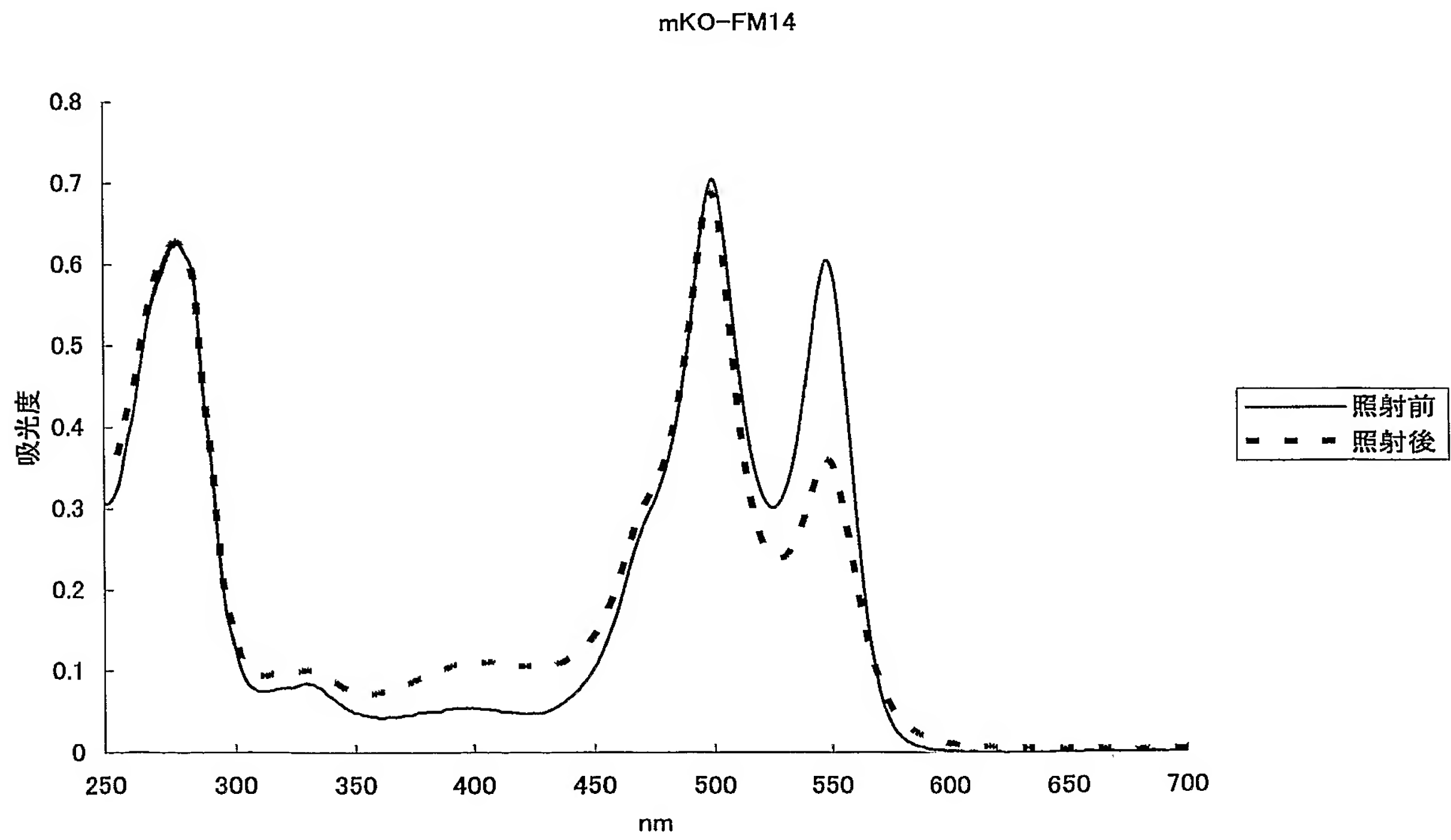


図 3 3

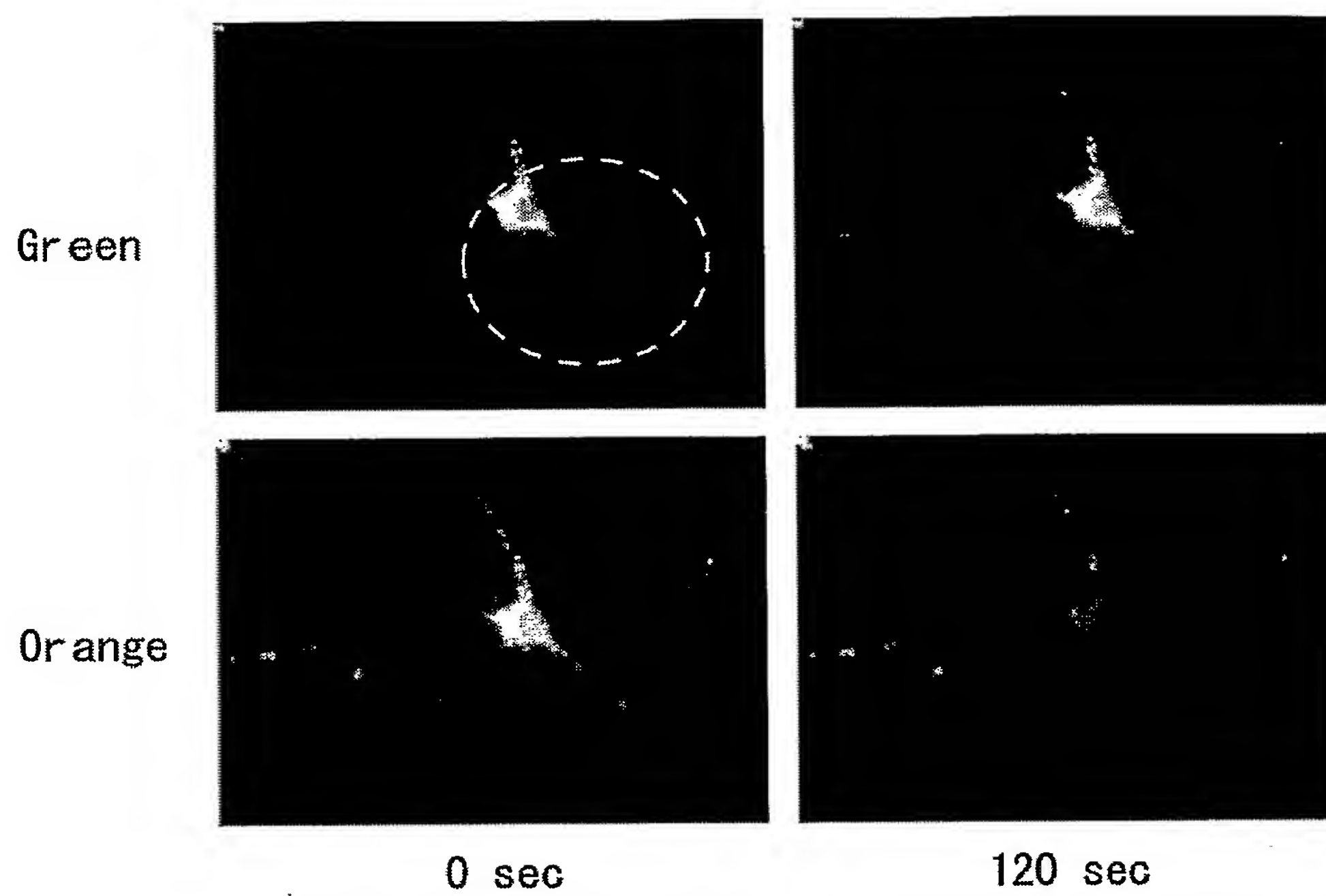


図 3 4

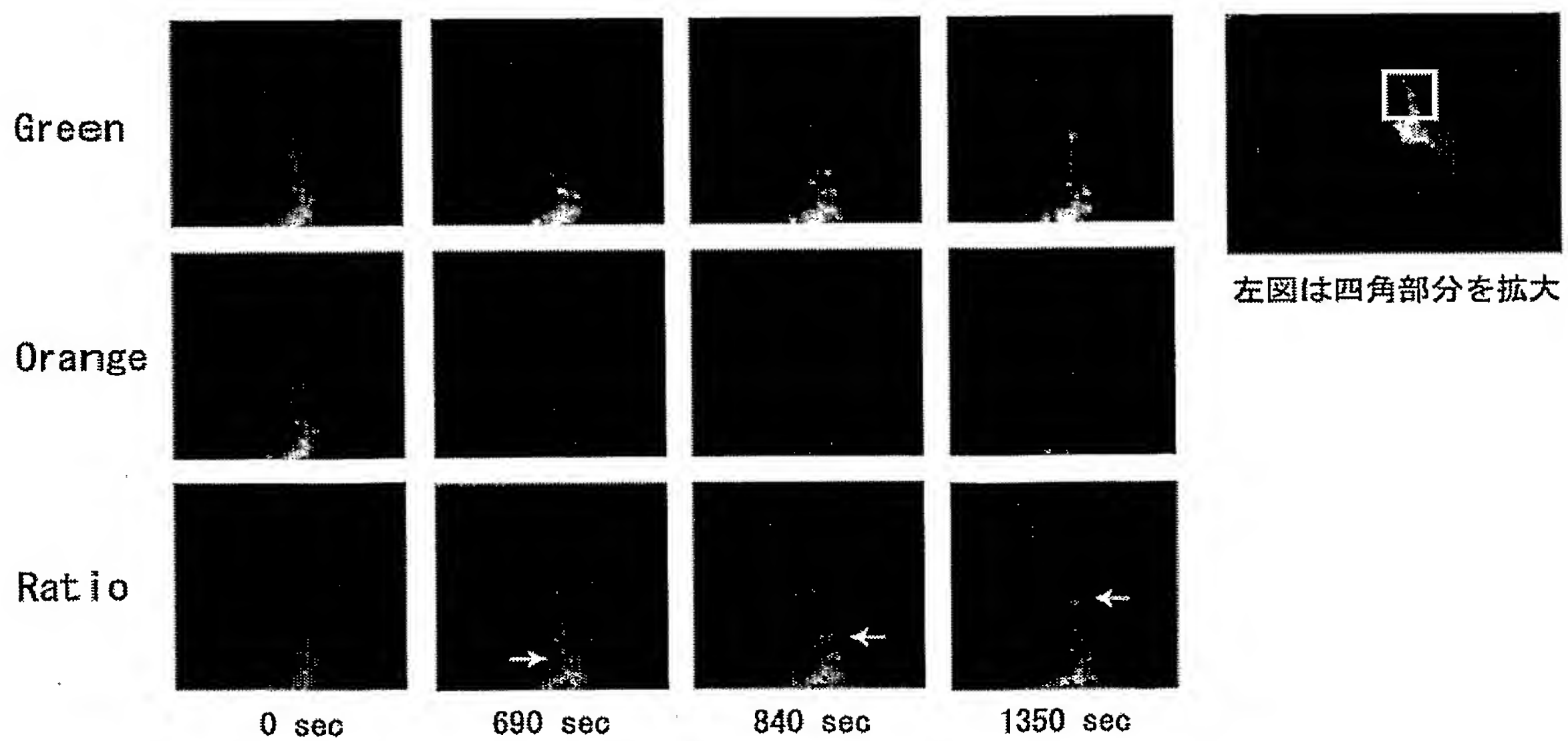


図 3 5

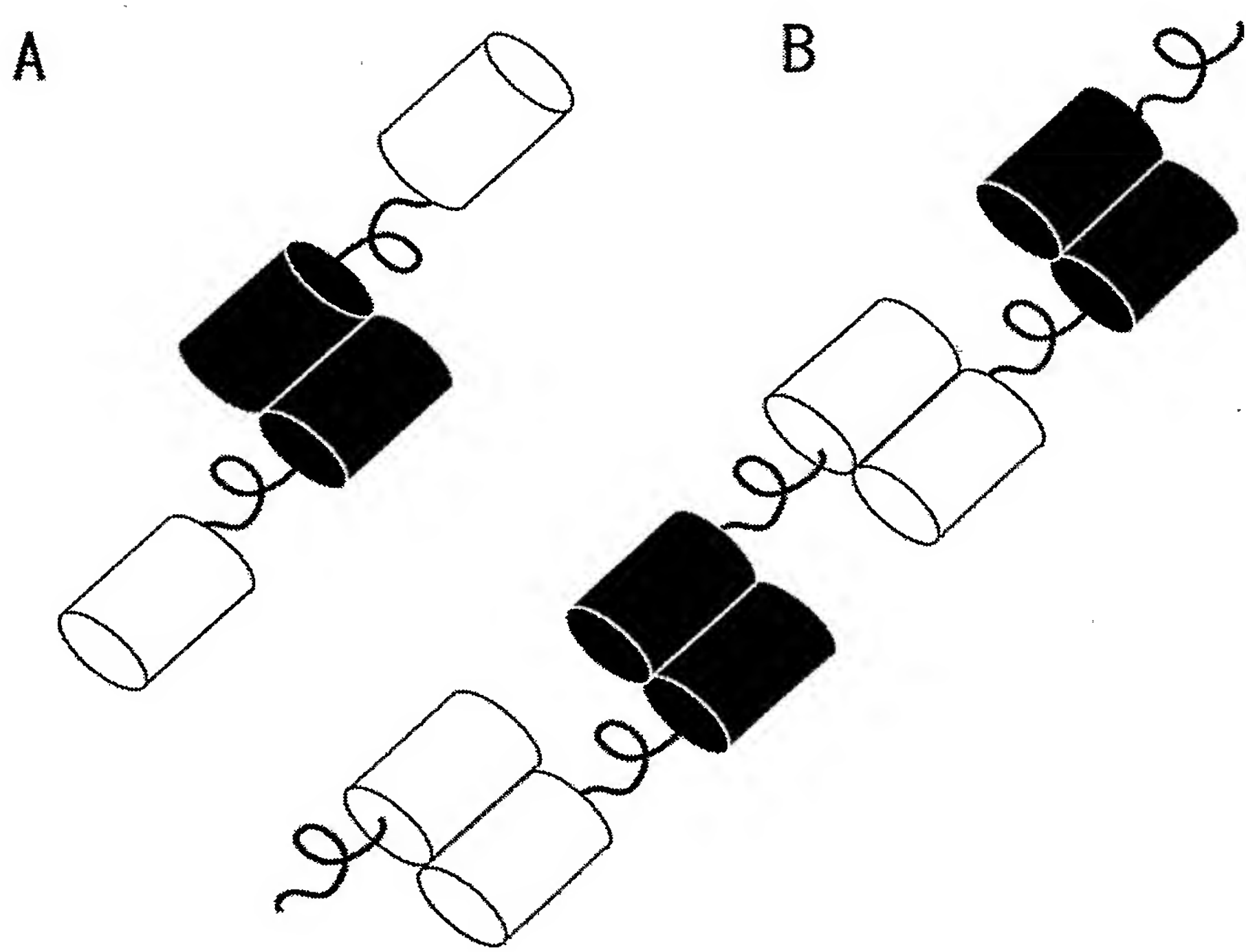


図 3 6

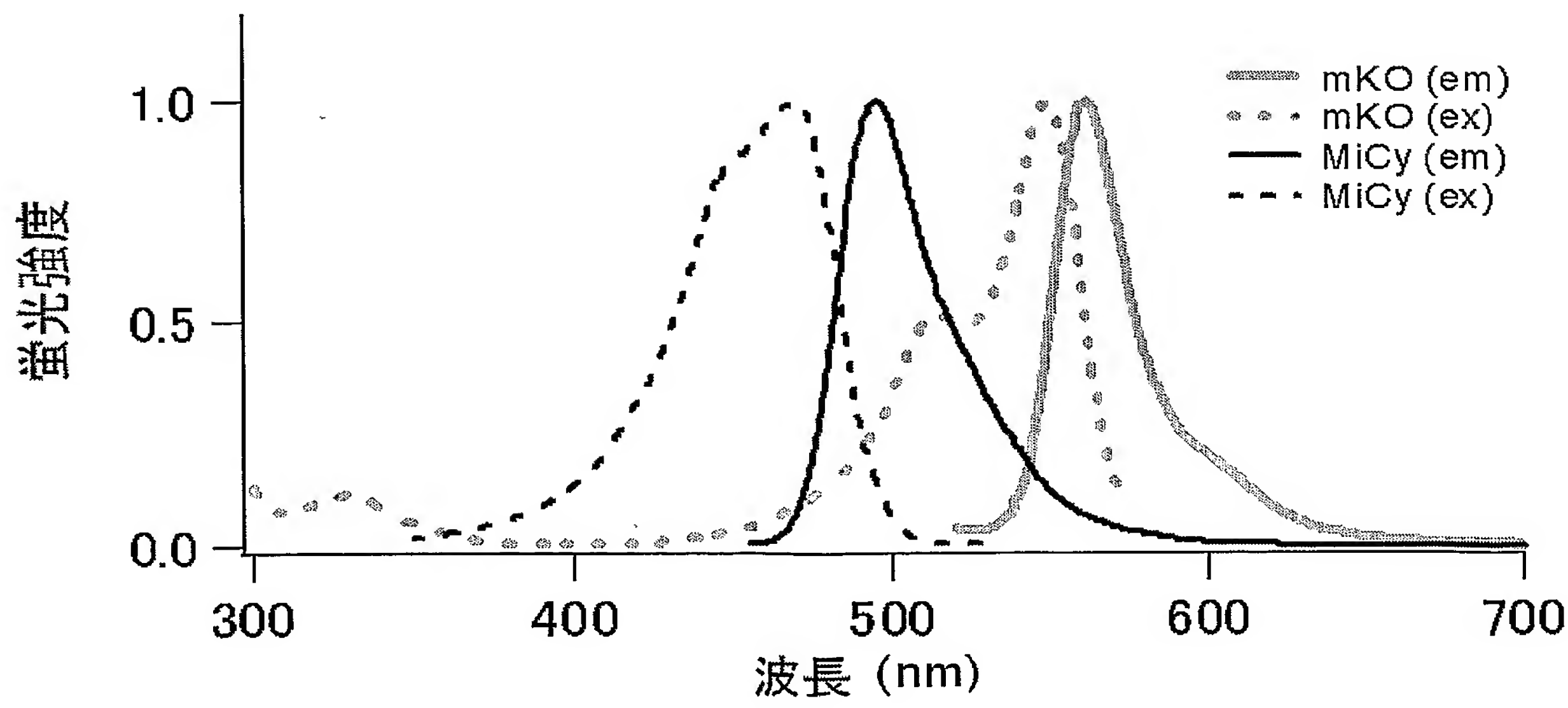


図 3 7

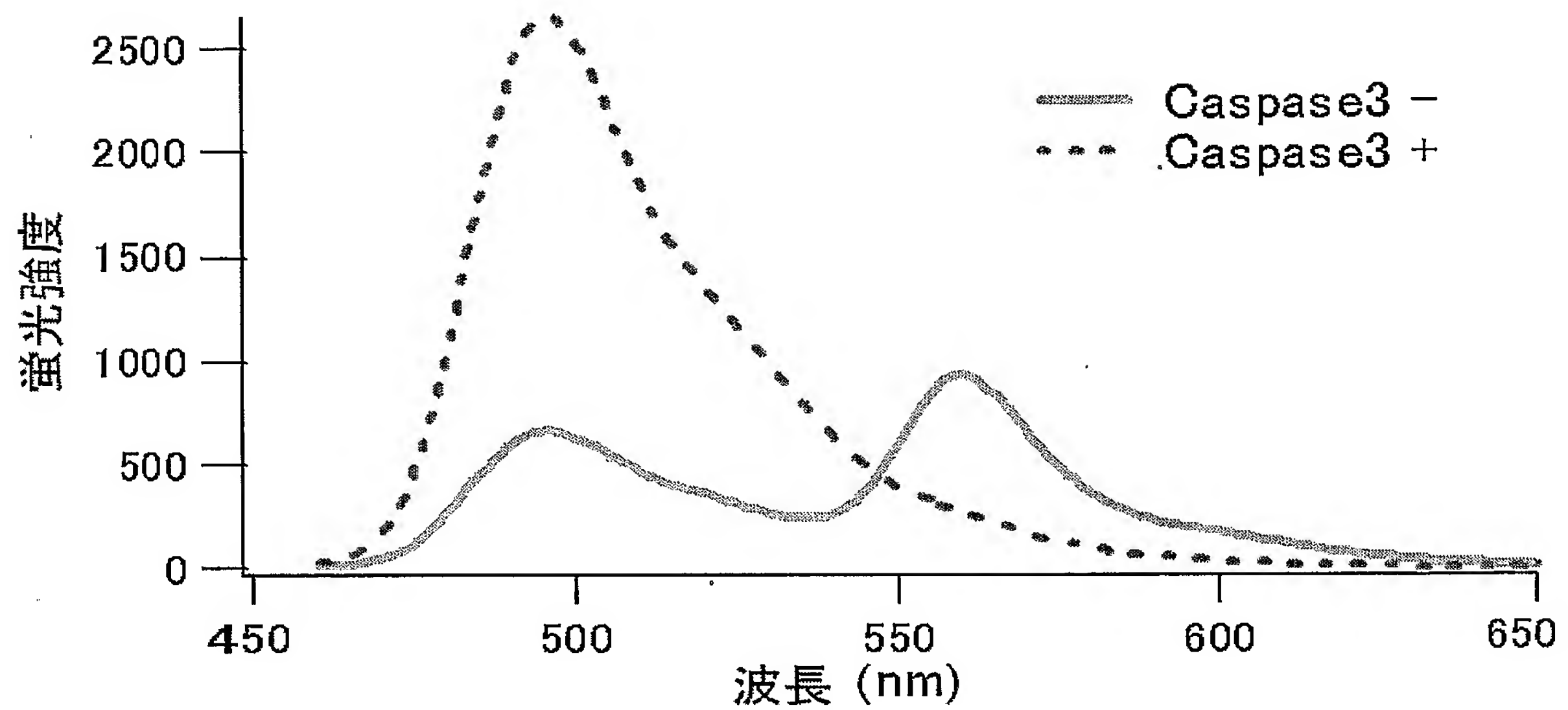
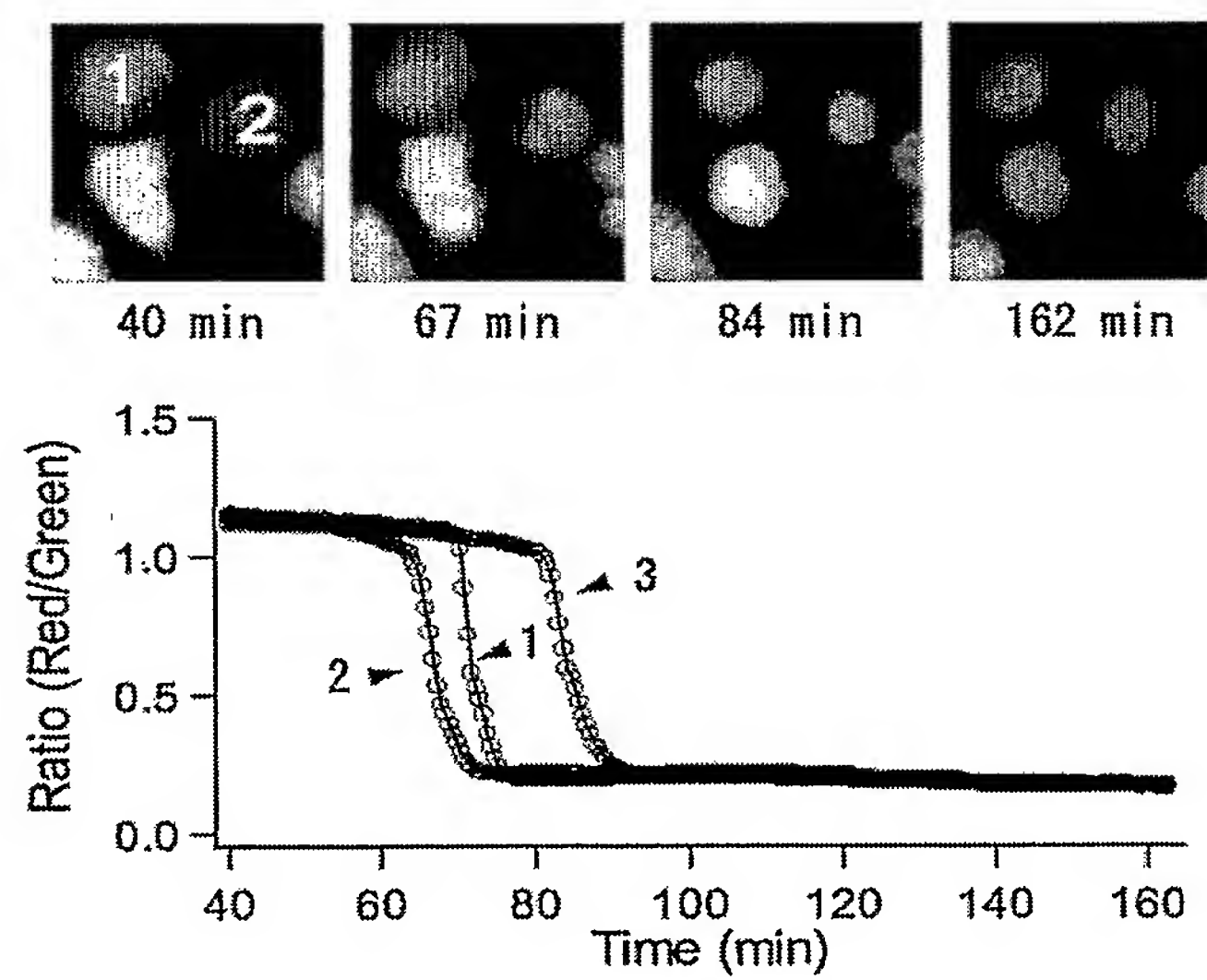


図 3 8



440AF21, 455DRLP, 480ALP
T 1%, binning 4, Exposure 187 ms
X40 Uapo/340, Interval 30sec

図 3 9

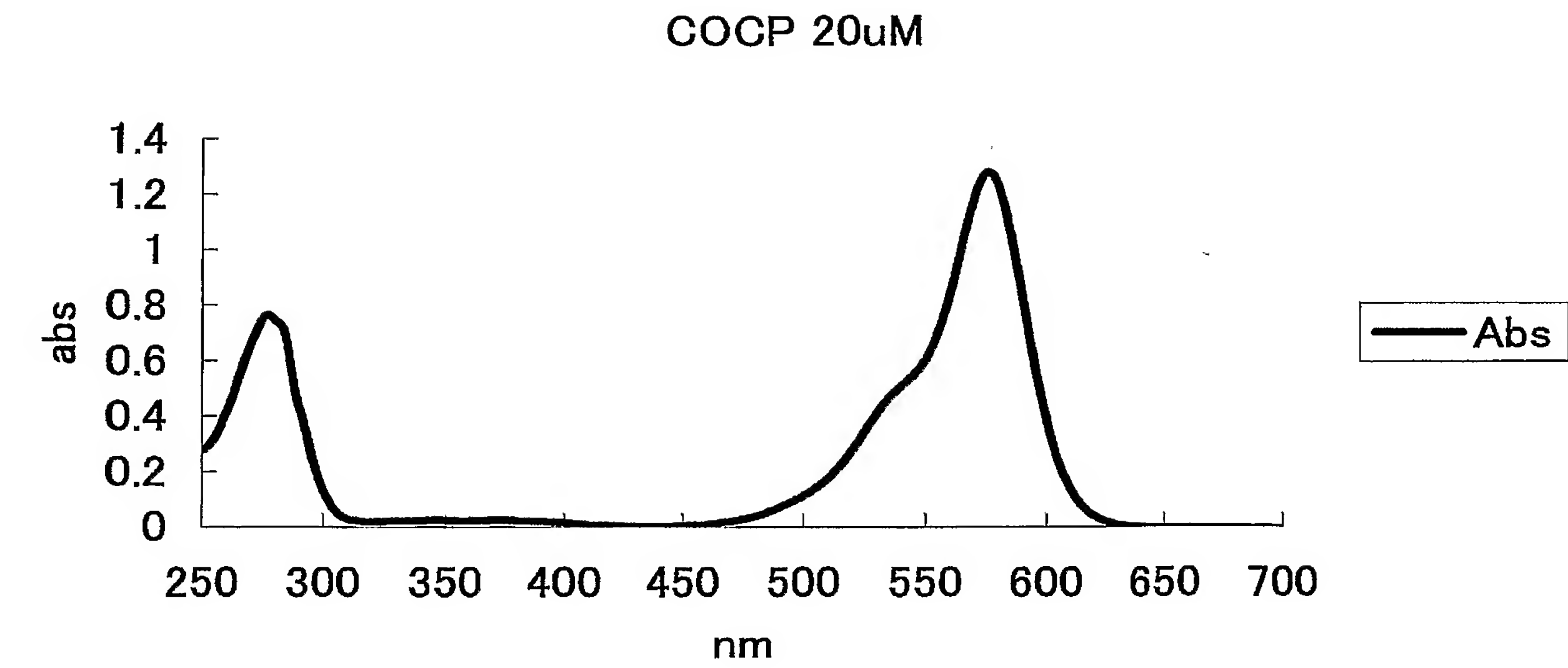


図 4 0

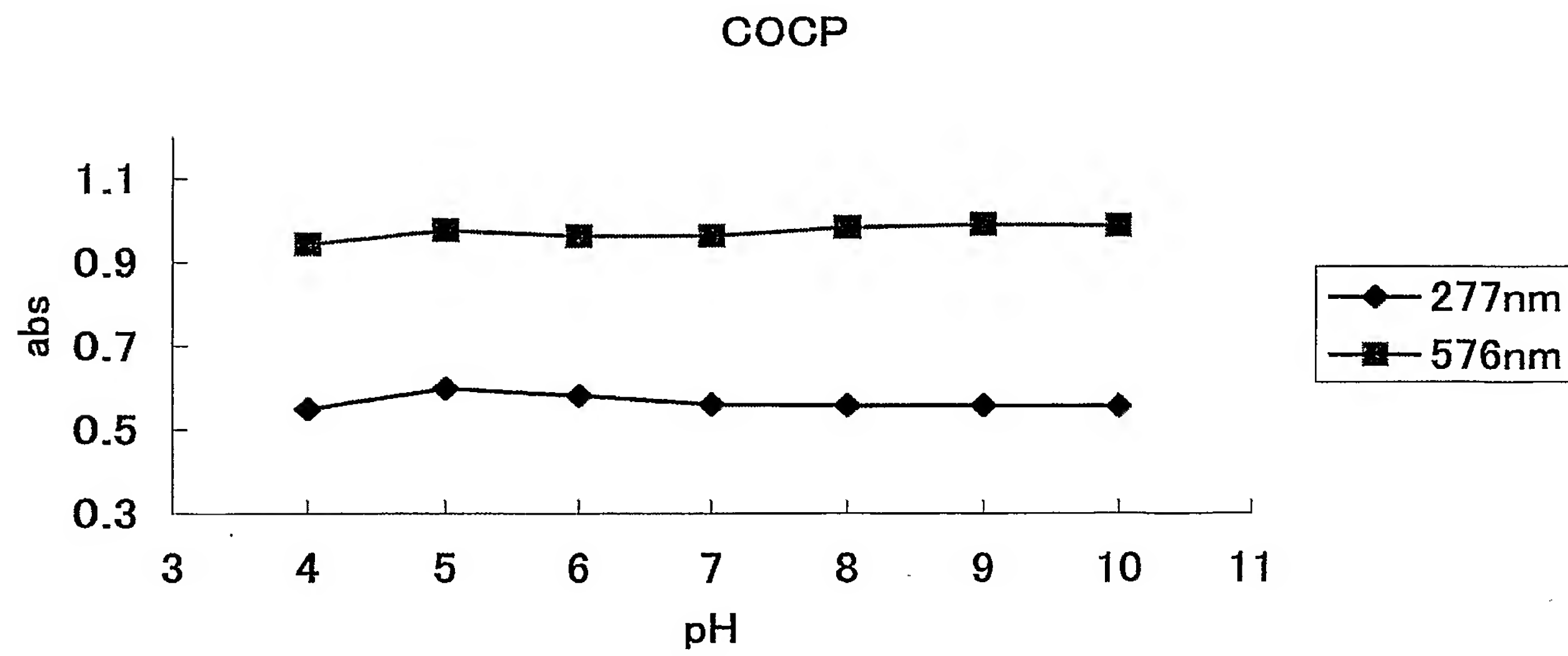


図 4 1

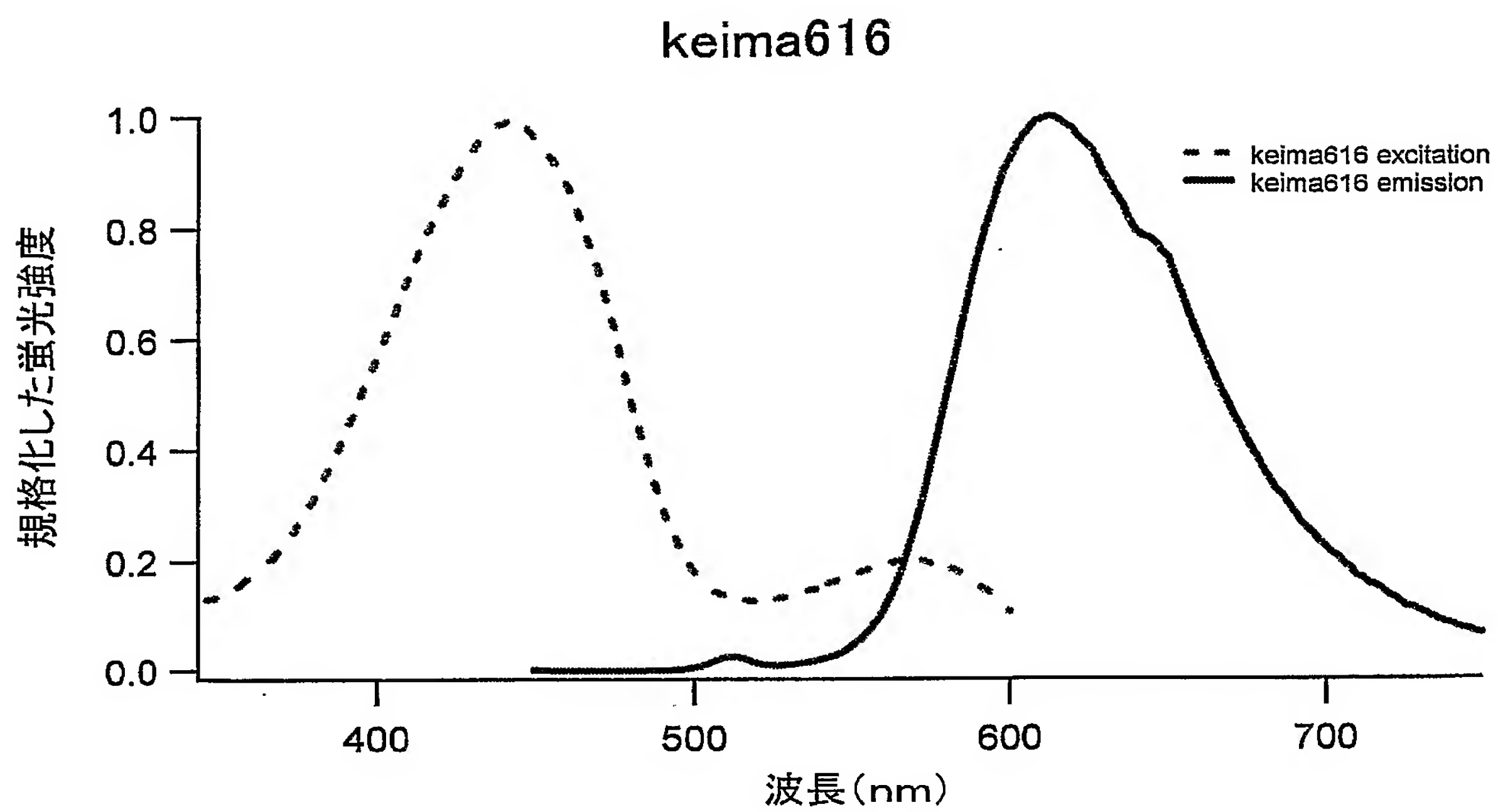


図 4 2

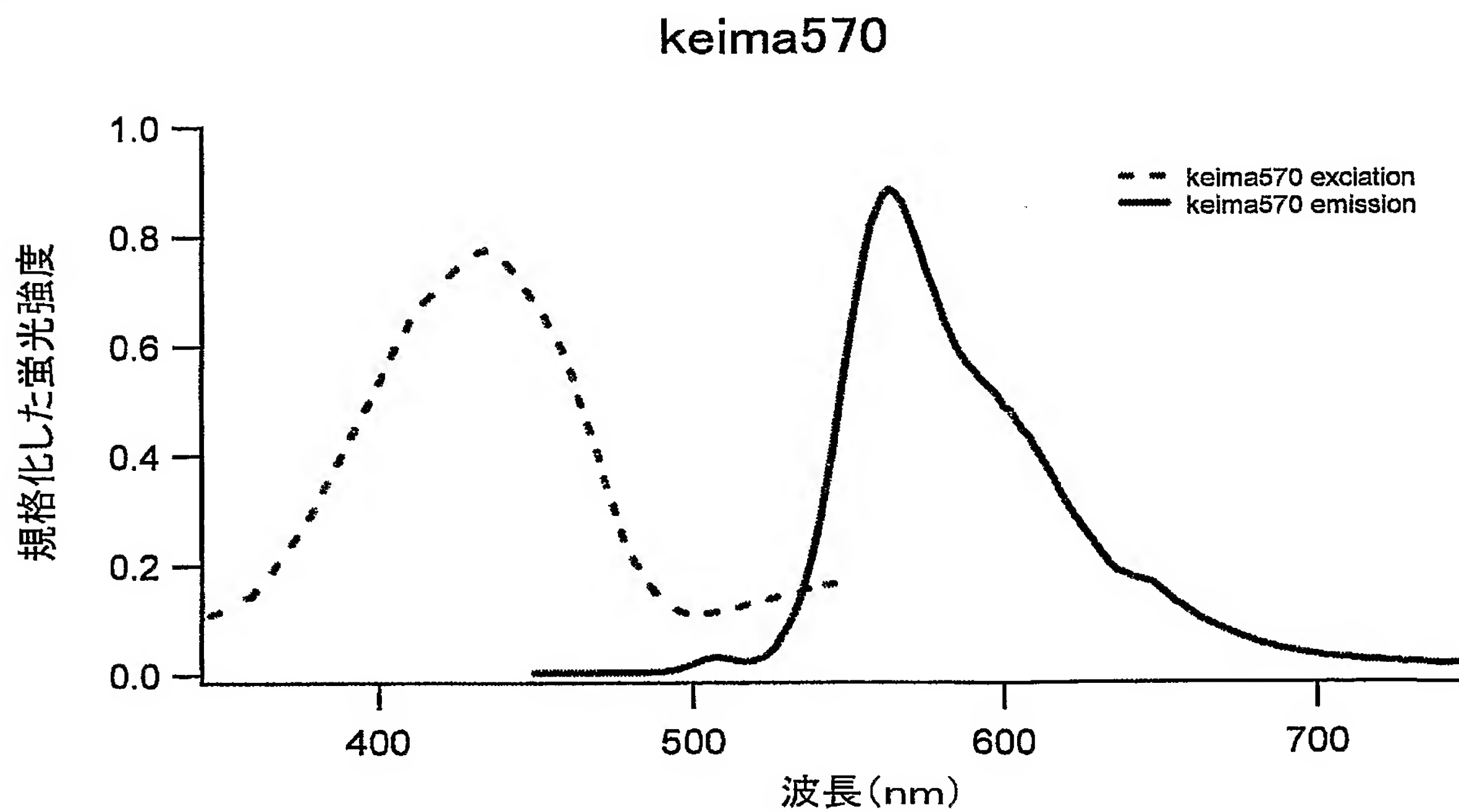


図 4 3

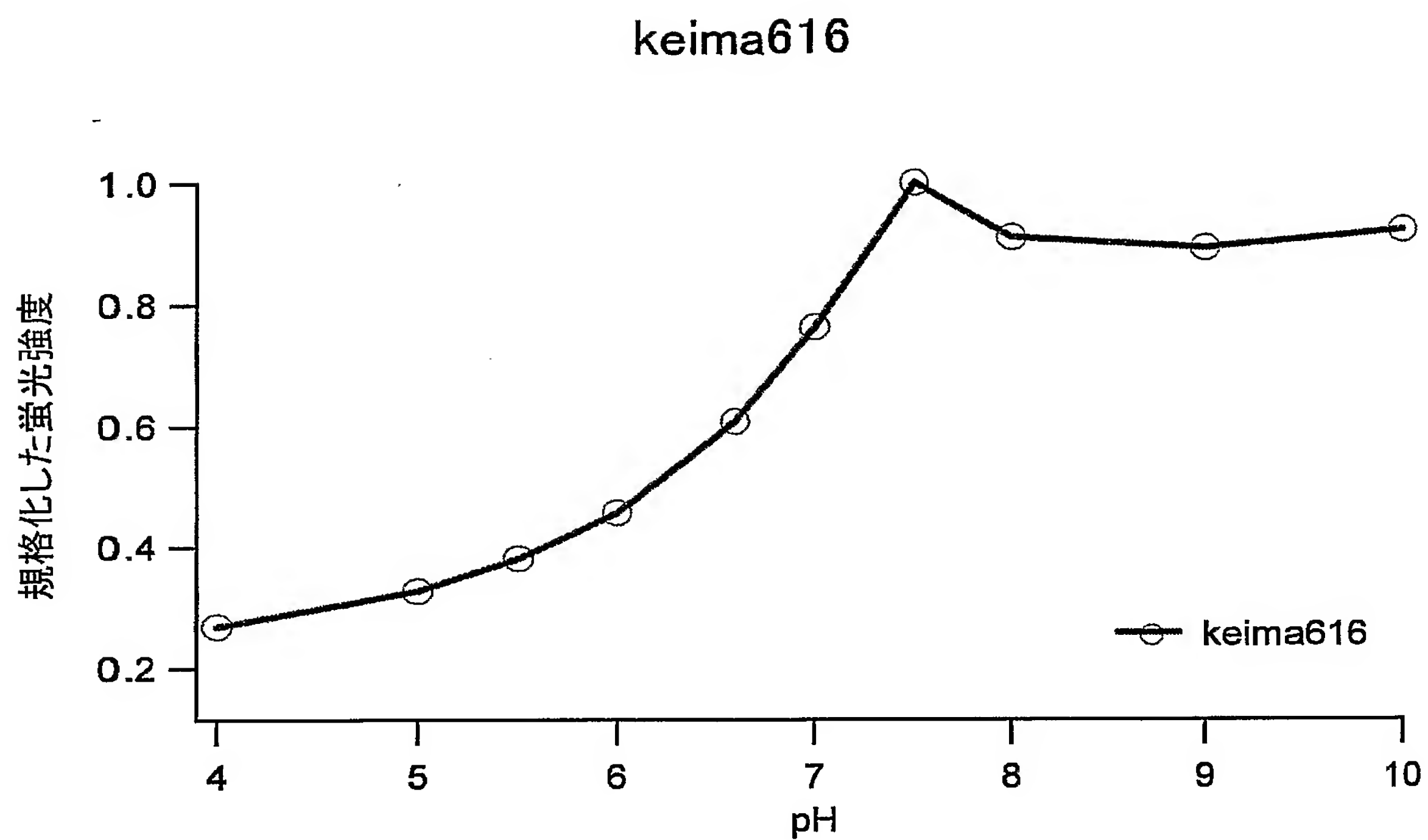


図 4 4

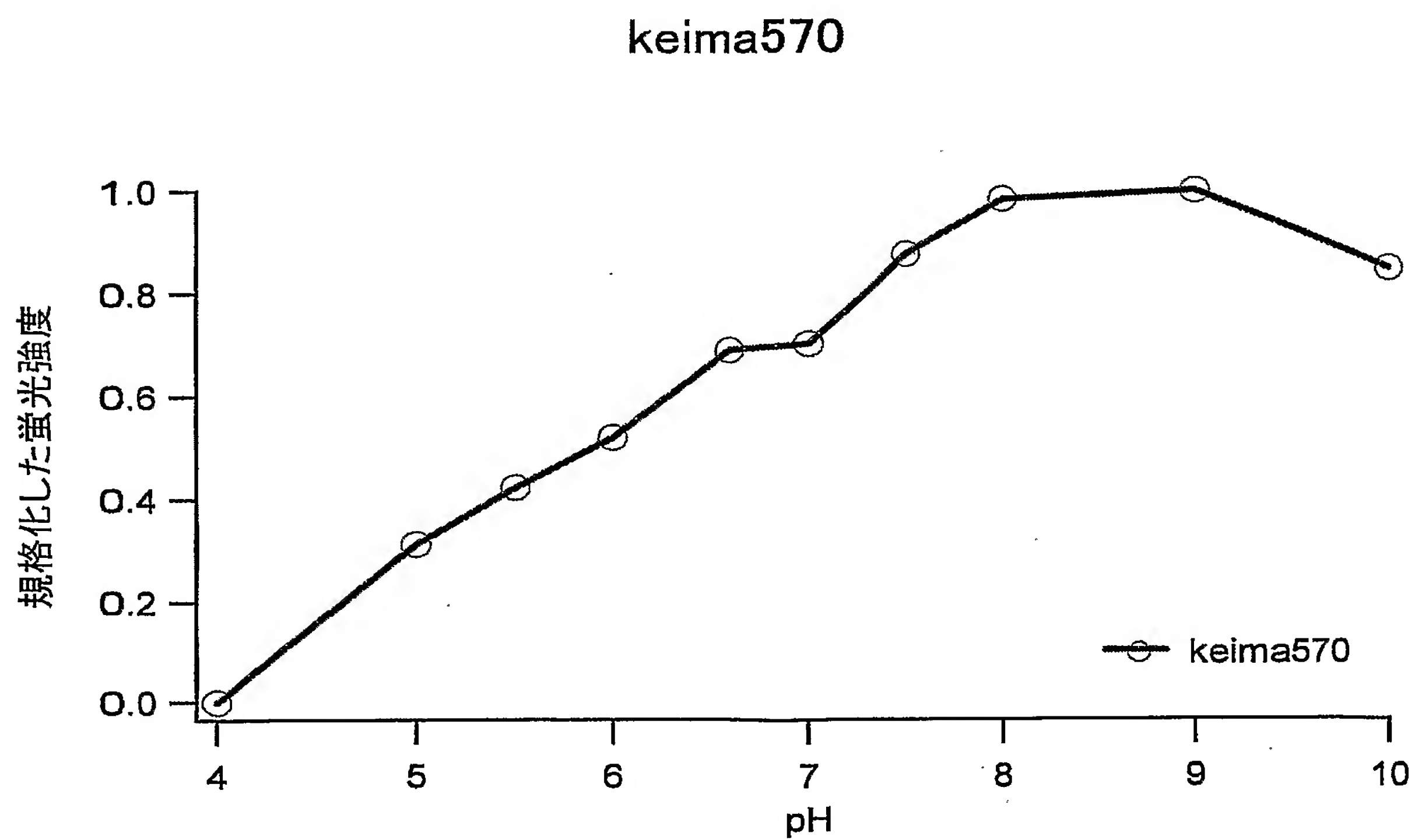


図 4 5

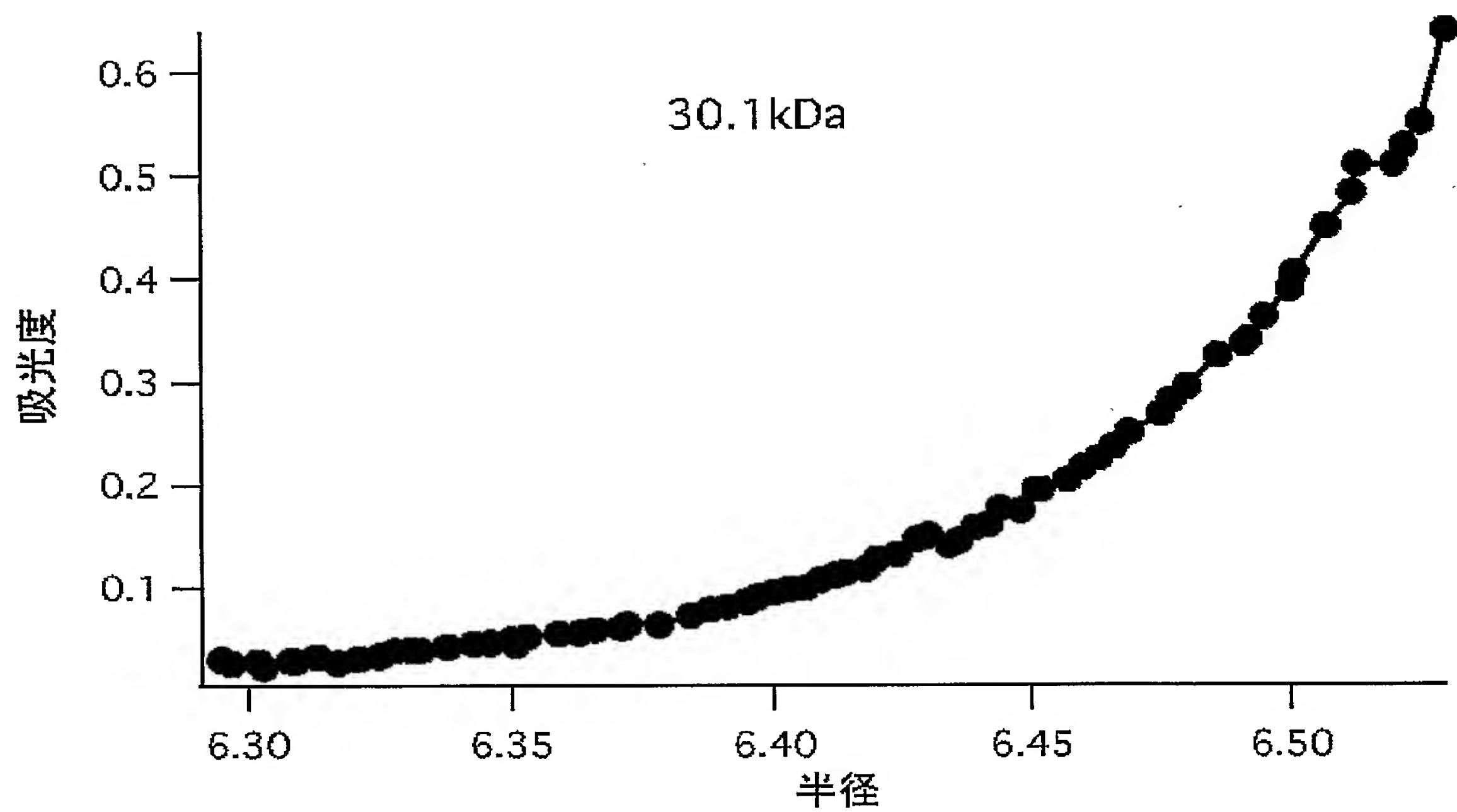


図 4 6

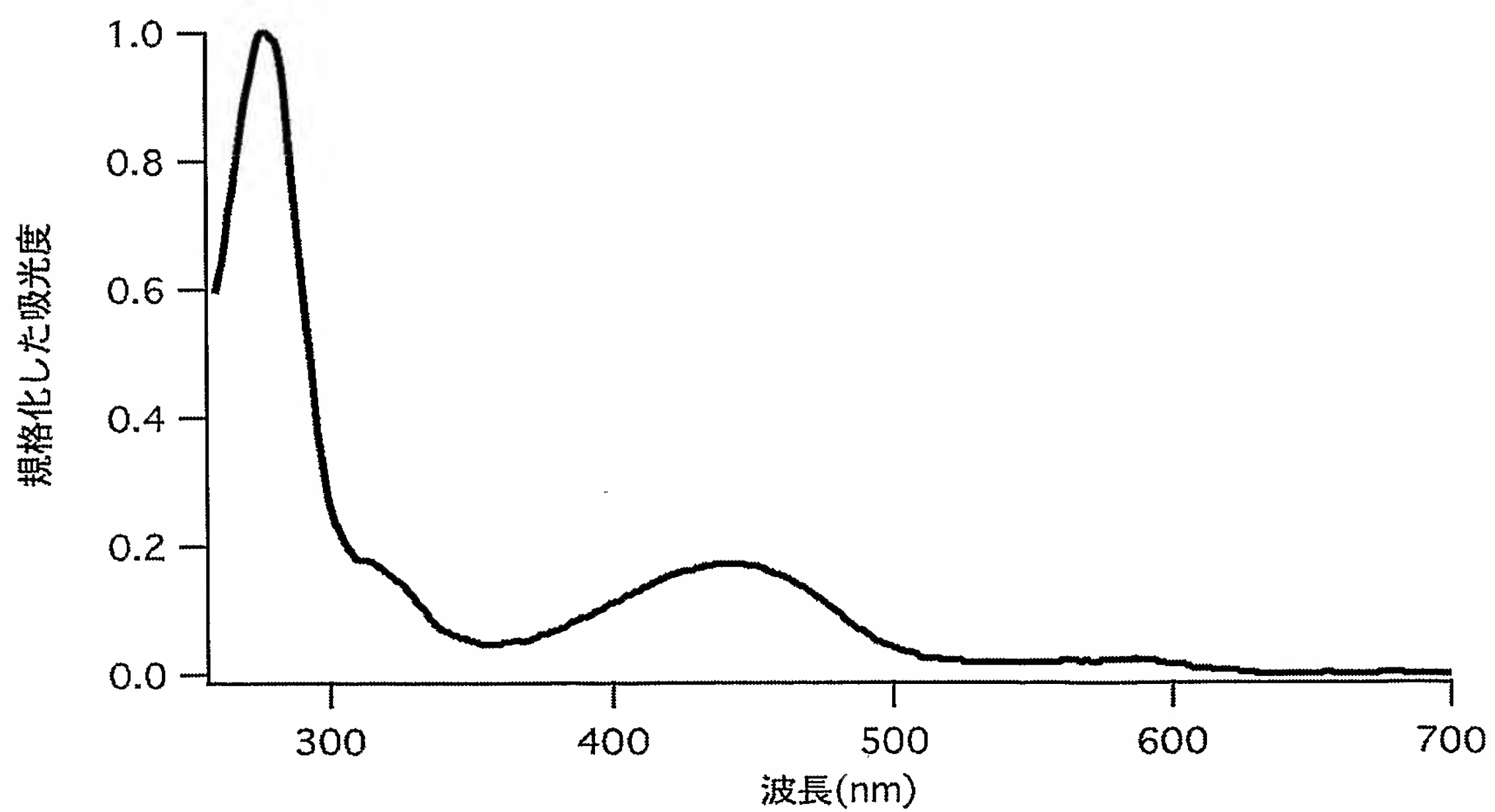


図 4 7

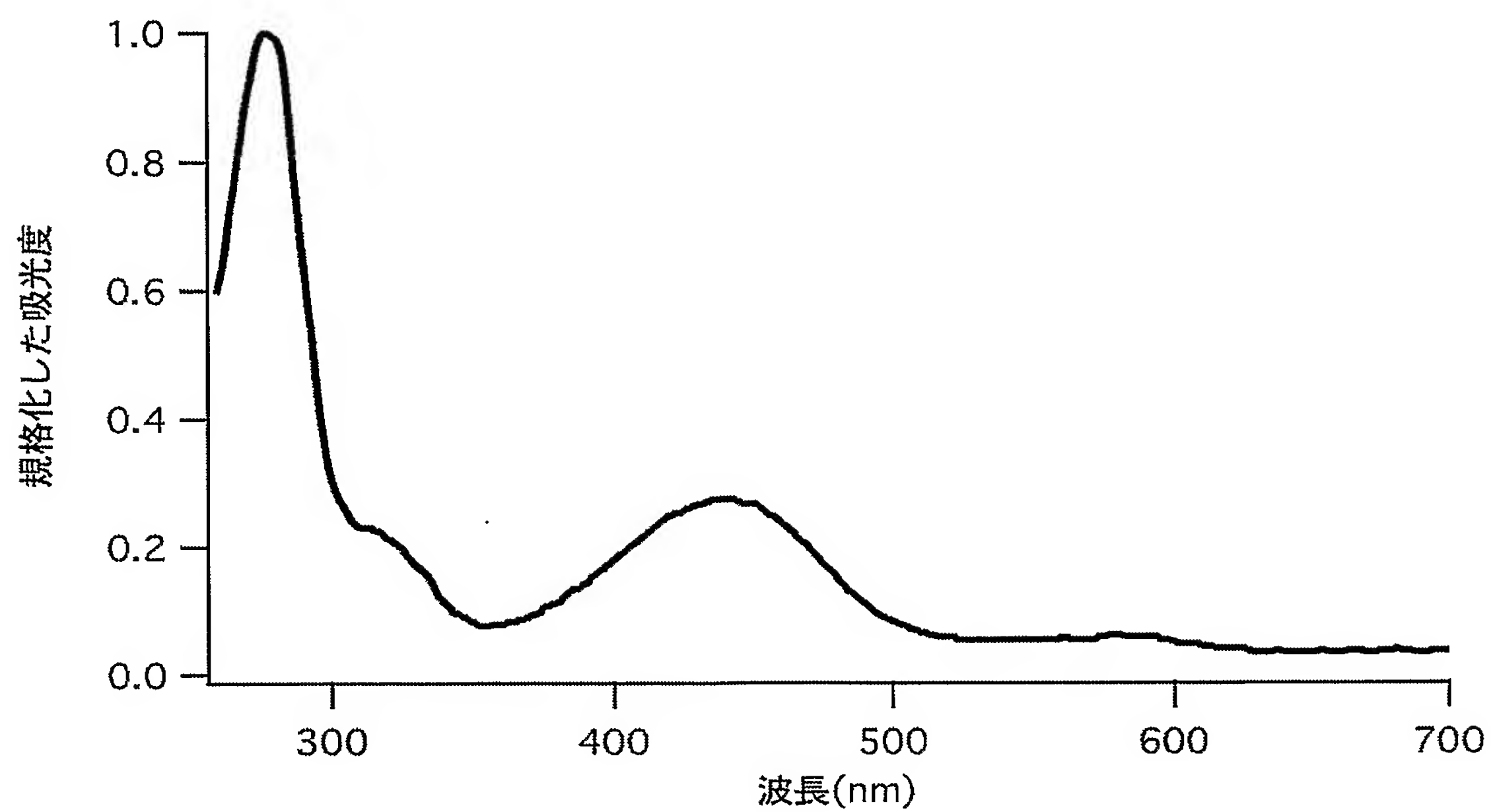


図 4 8

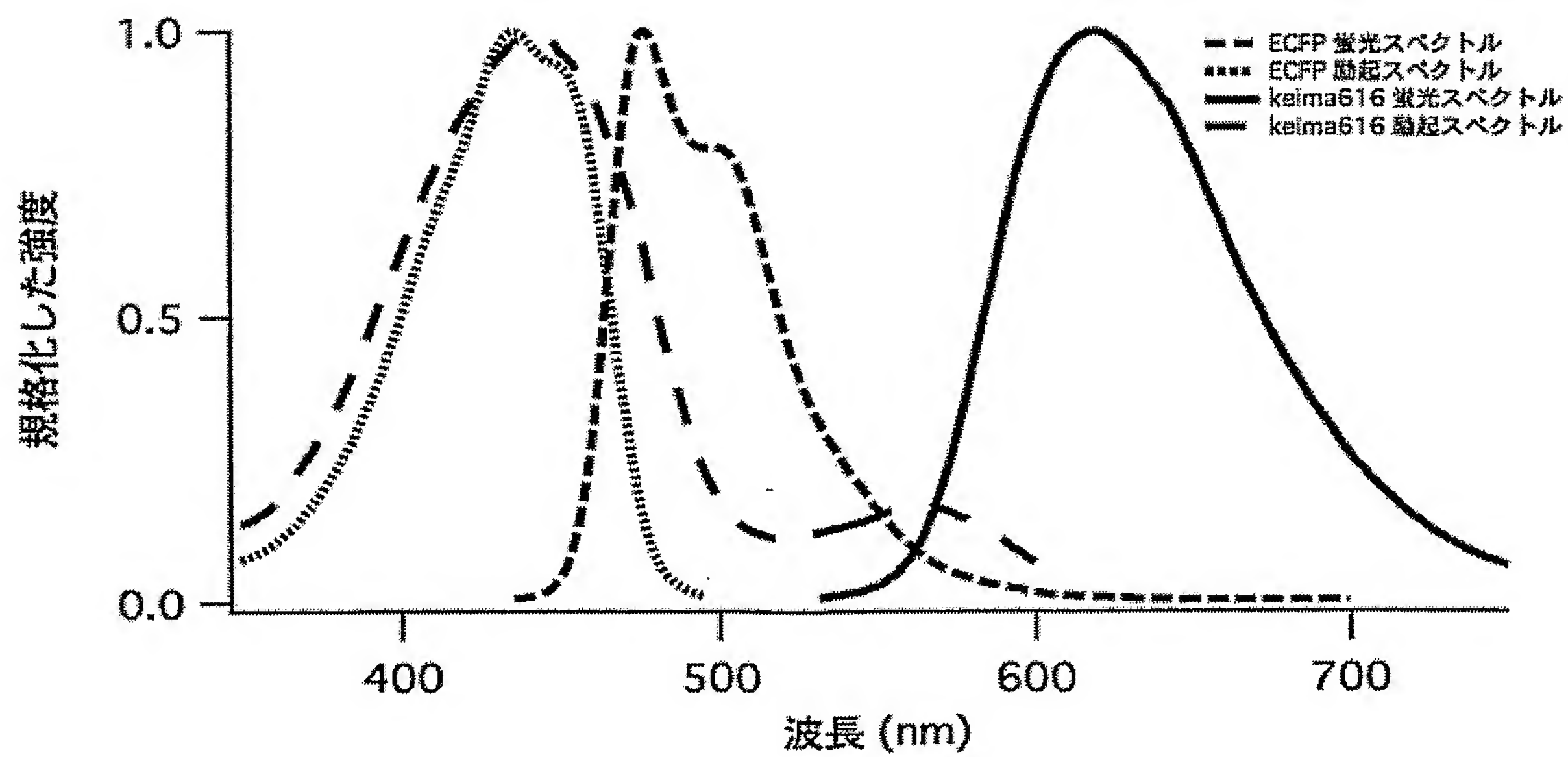


図 4 9

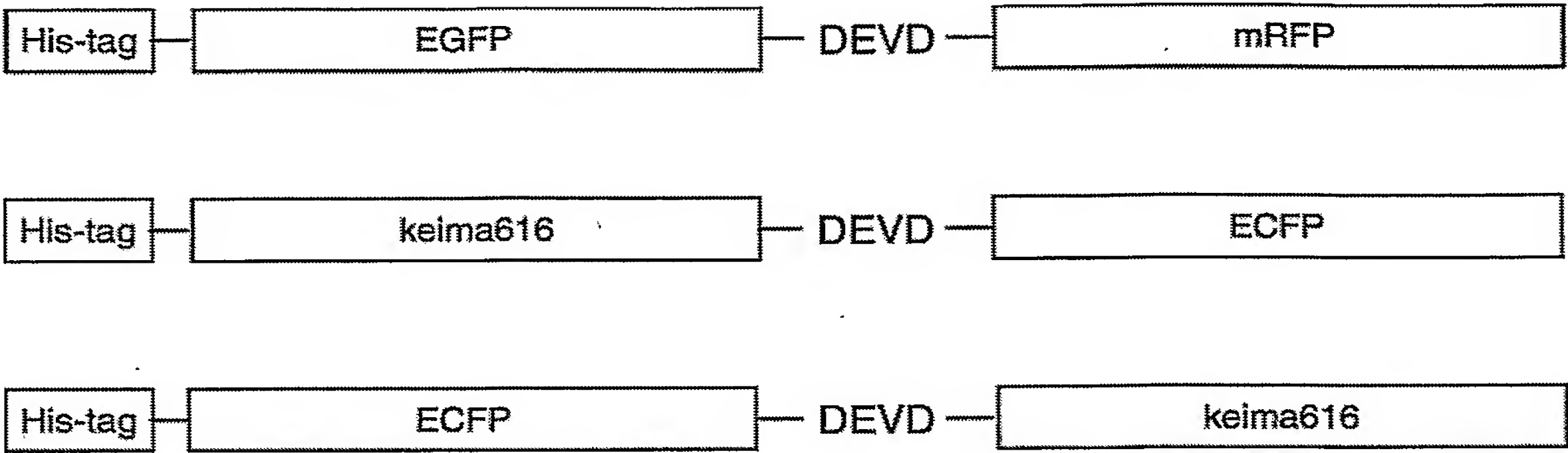


図 50

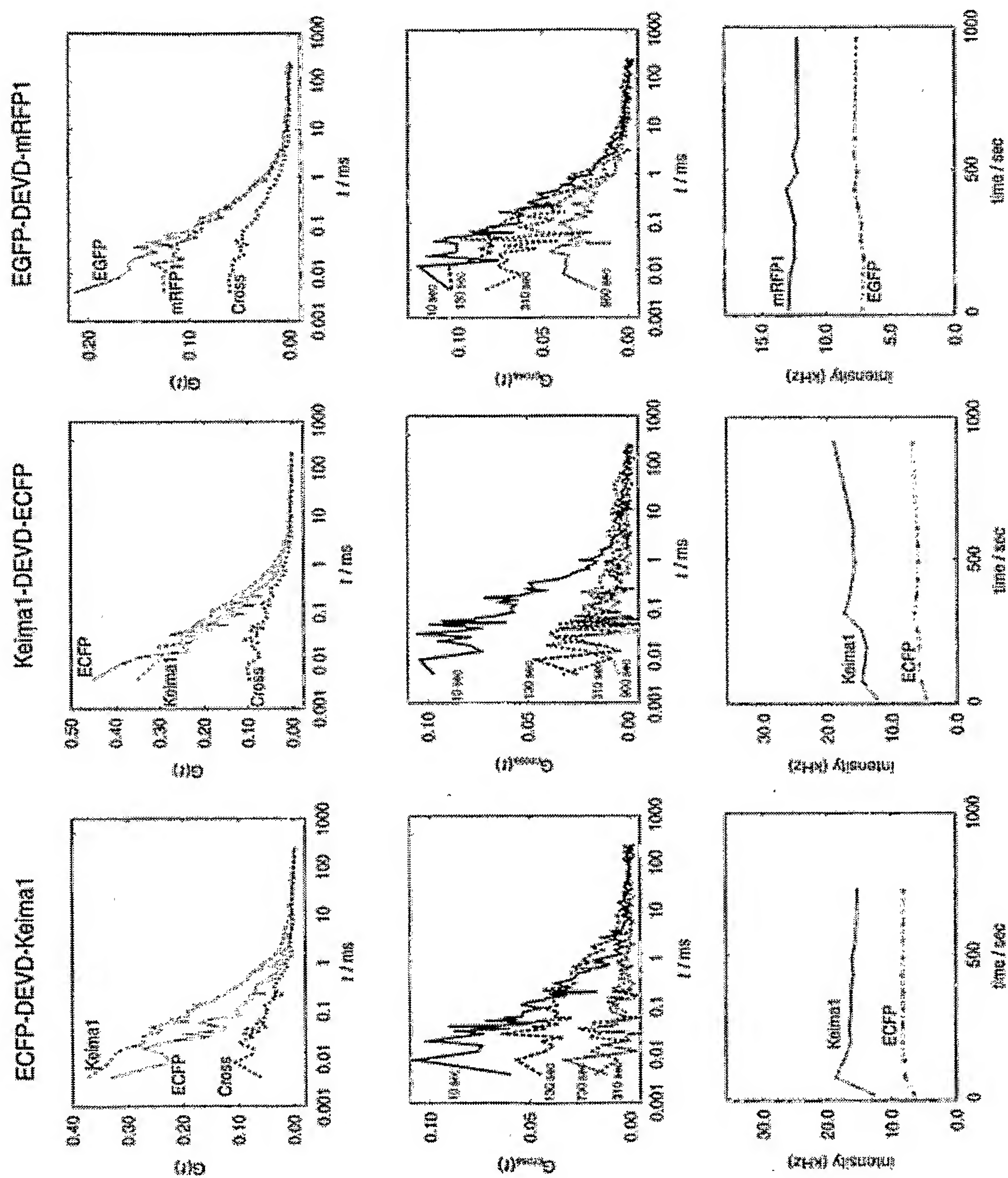


図 5 1

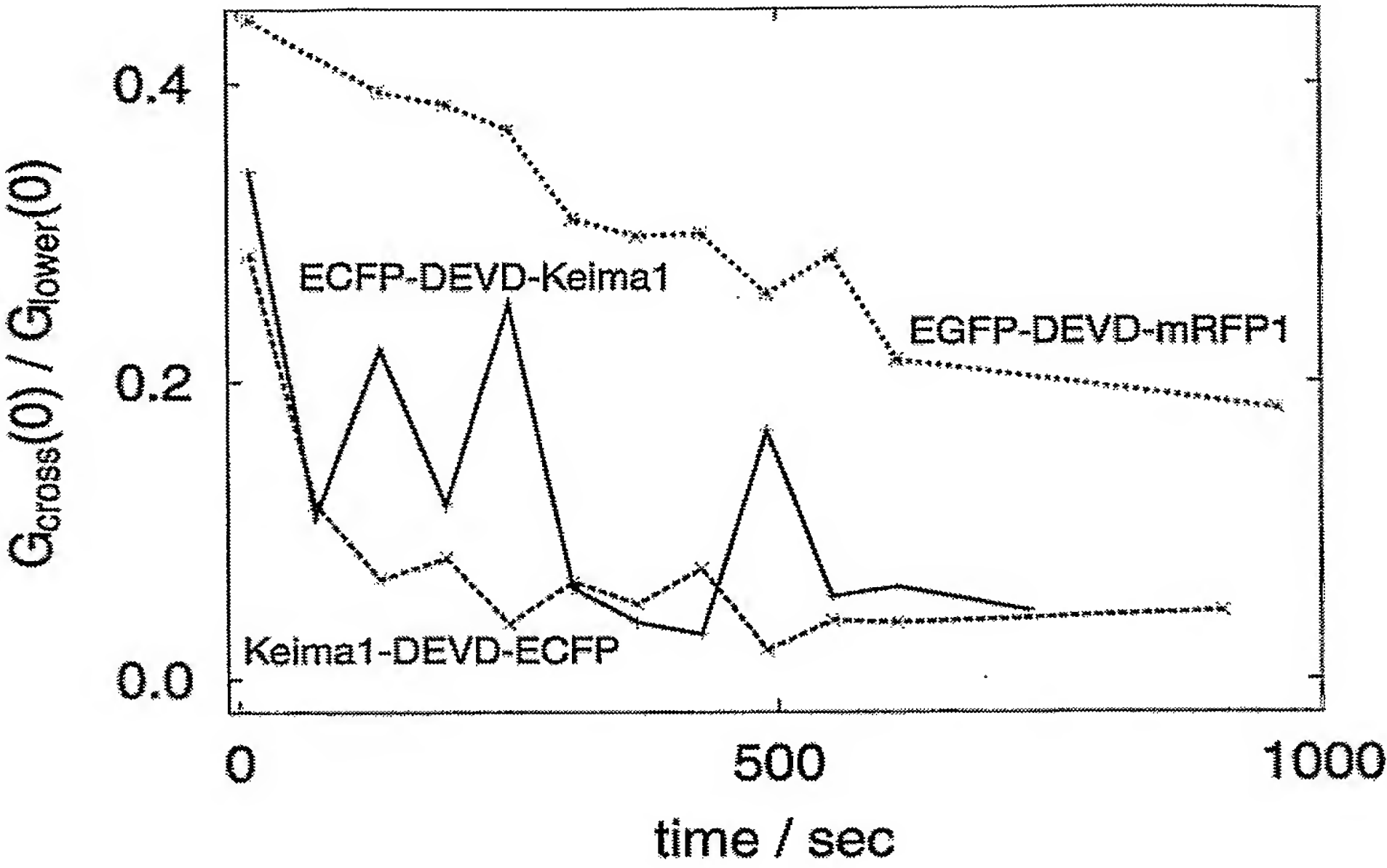


図 5 2

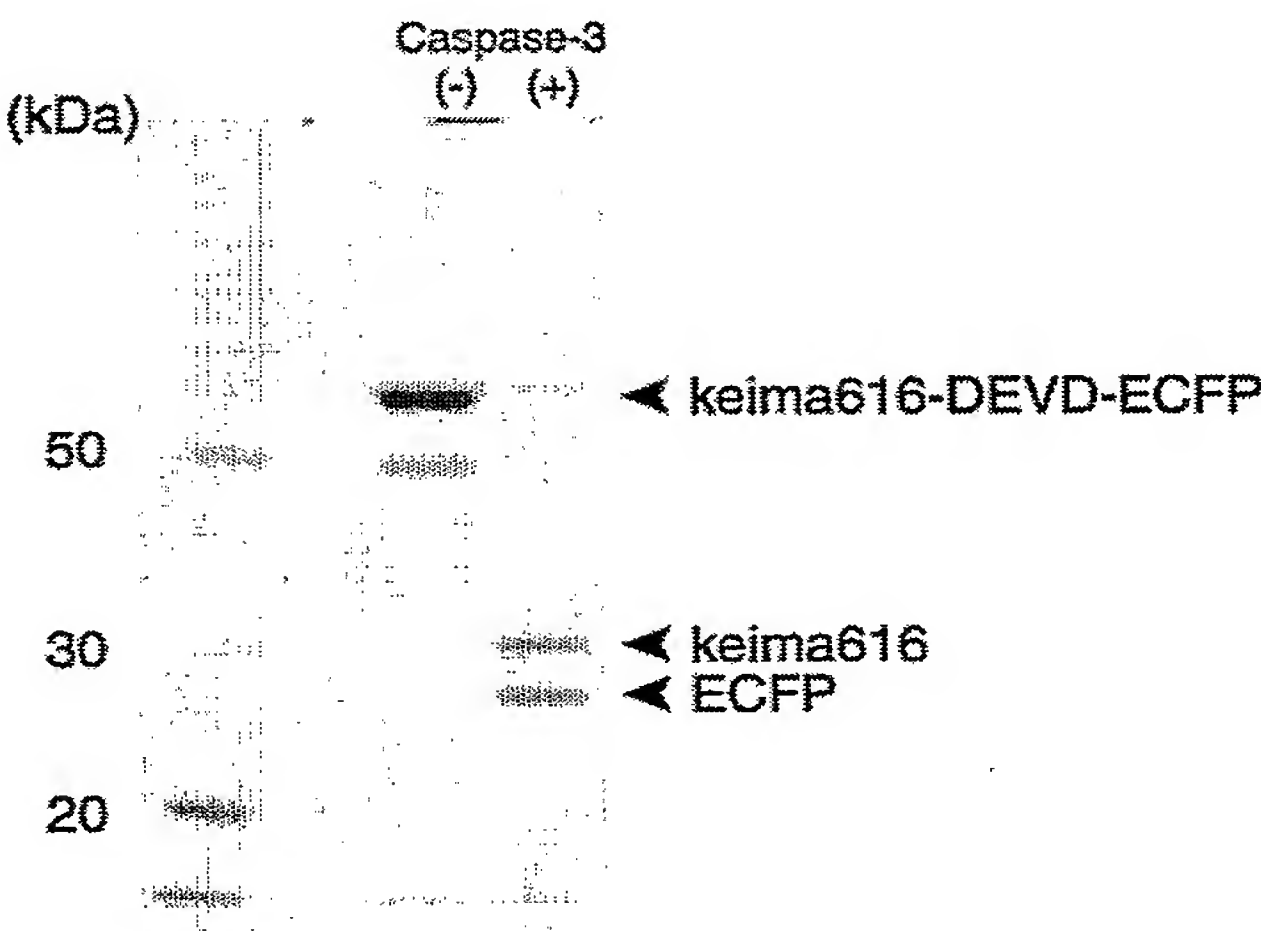


図 5 3

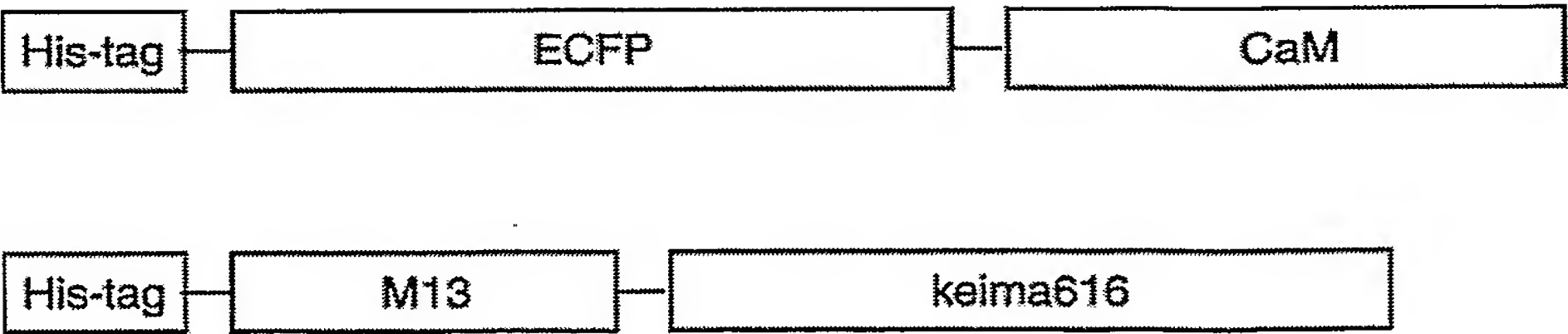


図 5 4

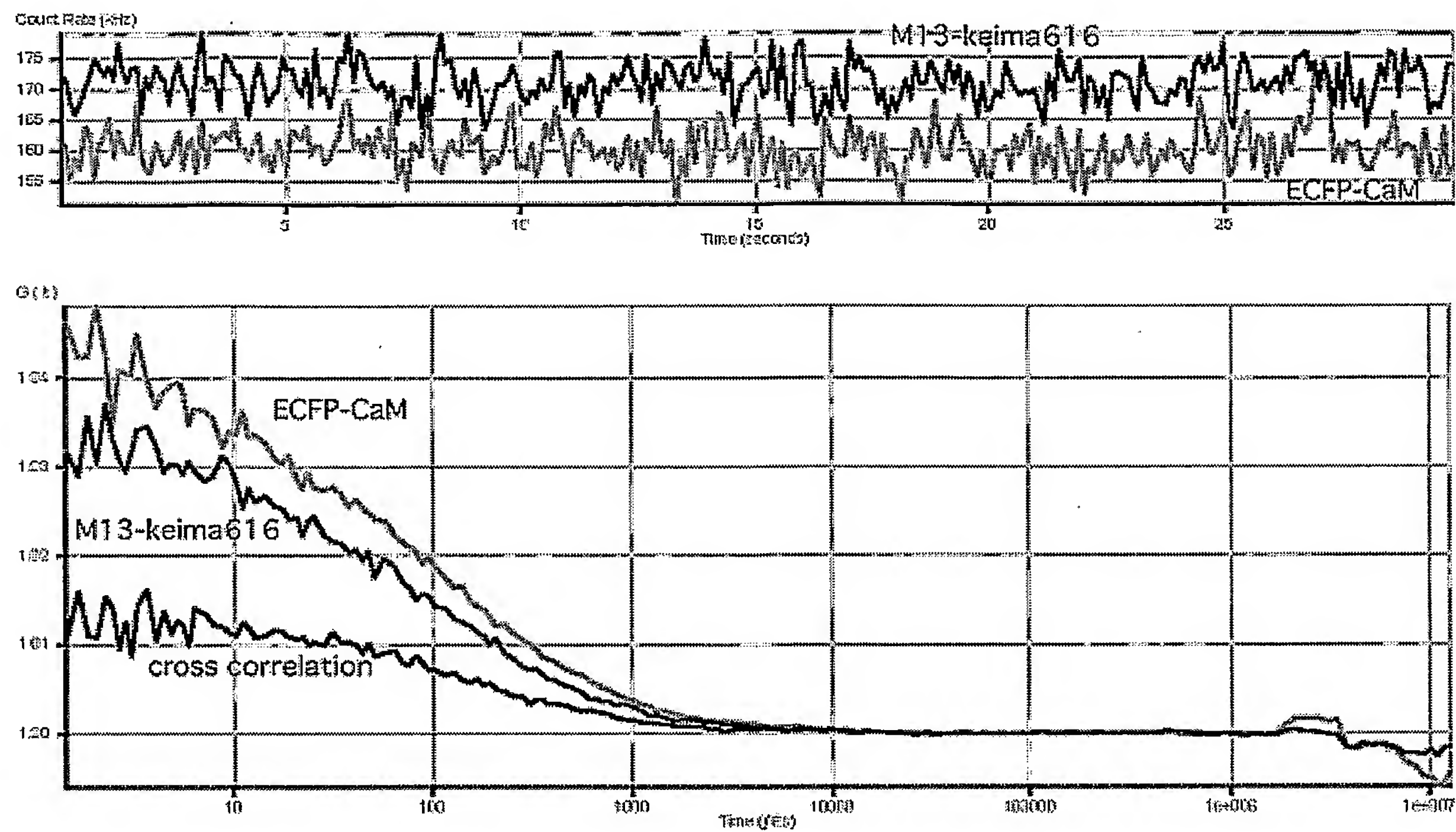
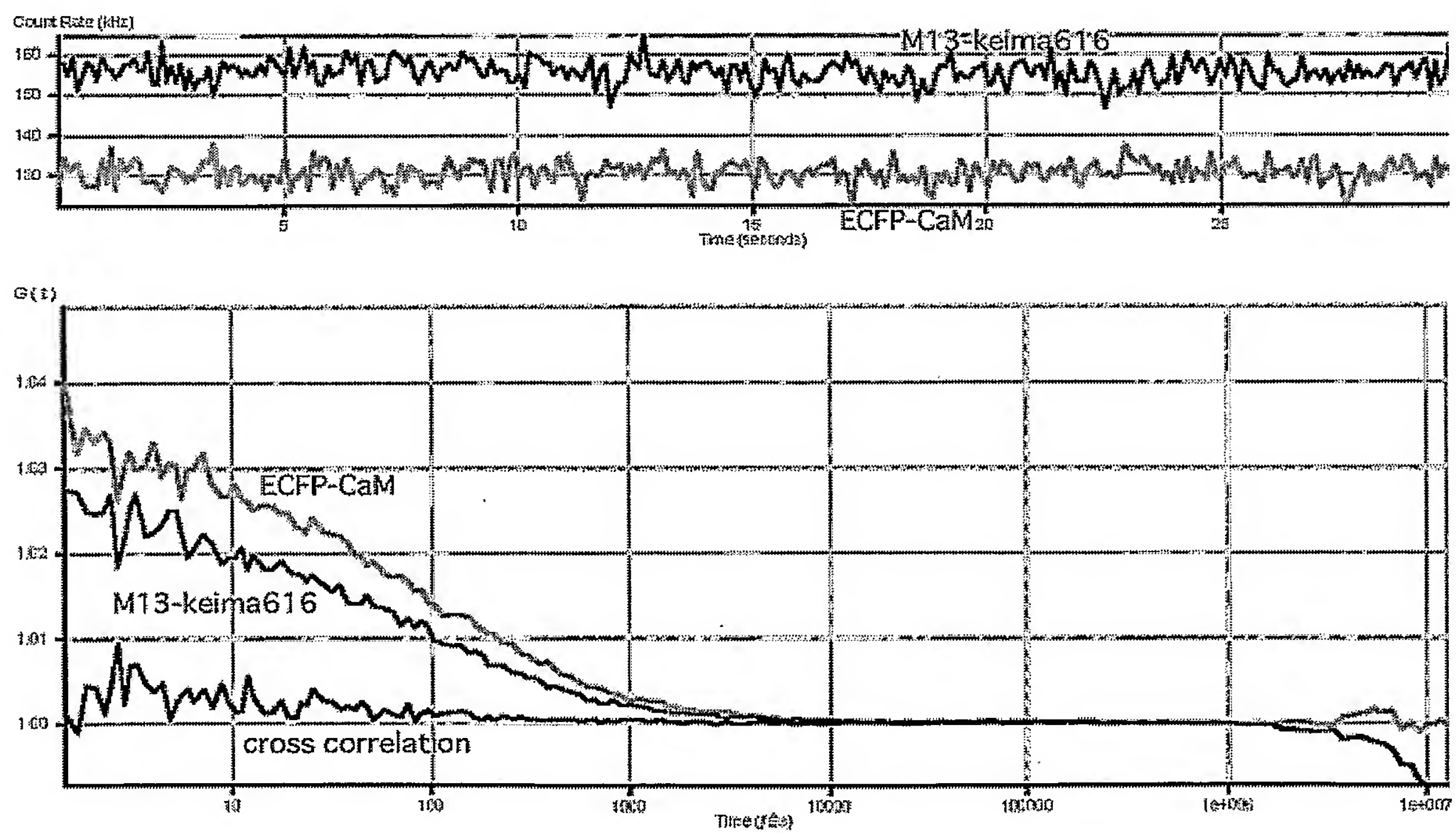


図 5 5



SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

<120> Fluorescent protein

<130> A41869A

<160> 81

<210> 1

<211> 218

<212> PRT

<213> Fungia sp.

<400> 1

Met Val Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys Met Arg Tyr Tyr Met Asp

1 5 10 15

Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly Glu Gly Thr Gly

20 25 30

Arg Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Met Thr Leu Arg Val Thr Met Ala

35 40 45

Lys Gly Gly Pro Met Pro Phe Ala Phe Asp Leu Val Ser His Val Phe

50 55 60

Cys Tyr Gly His Arg Pro Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Glu Ile Pro Asp

65 70 75 80

Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu Ser Trp Glu Arg Ser Leu

85 90 95

Glu Phe Glu Asp Gly Gly Ser Ala Ser Val Ser Ala His Ile Ser Leu

100 105 110

Arg Gly Asn Thr Phe Tyr His Lys Ser Lys Phe Thr Gly Val Asn Phe

115 120 125

Pro Ala Asp Gly Pro Ile Met Gln Asn Gln Ser Val Asp Trp Glu Pro

130 135 140
 Ser Thr Glu Lys Ile Thr Ala Ser Asp Gly Val Leu Lys Gly Asp Val
 145 150 155 160
 Thr Met Tyr Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Asn His Lys Cys Gln Phe
 165 170 175
 Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Lys Ile Leu Lys Met Pro Gly Ser
 180 185 190
 His Tyr Ile Ser His Arg Leu Val Arg Lys Thr Glu Gly Asn Ile Thr
 195 200 205
 Glu Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Ser

210

215

<210> 2

<211> 657

<212> DNA

<213> *Fungia* sp.

<400> 2

atg gtg agt gtg att aaa cca gag atg aag atg agg tac tac atg gac 48
 Met Val Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys Met Arg Tyr Tyr Met Asp
 1 5 10 15
 ggc tcc gtc aat ggg cat gag ttc aca att gaa ggt gaa ggc aca ggc 96
 Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly Glu Gly Thr Gly
 20 25 30
 aga cct tac gag gga cat caa gag atg aca cta cgc gtc aca atg gcc 144
 Arg Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Met Thr Leu Arg Val Thr Met Ala
 35 40 45
 aag ggc ggg cca atg cct ttc gcg ttt gac tta gtg tca cac gtg ttc 192
 Lys Gly Gly Pro Met Pro Phe Ala Phe Asp Leu Val Ser His Val Phe

50 55 60
tgt tac ggc cac aga cct ttt act aaa tat cca gaa gag ata cca gac 240
Cys Tyr Gly His Arg Pro Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Glu Ile Pro Asp
65 70 75 80
tat ttc aaa caa gca ttt cct gaa ggc ctg tca tgg gaa agg tcg ttg 288
Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu Ser Trp Glu Arg Ser Leu
85 90 95
gag ttc gaa gat ggt ggg tcc gct tca gtc agt gcg cat ata agc ctt 336
Glu Phe Glu Asp Gly Gly Ser Ala Ser Val Ser Ala His Ile Ser Leu
100 105 110
aga gga aac acc ttc tac cac aaa tcc aaa ttt act ggg gtt aac ttt 384
Arg Gly Asn Thr Phe Tyr His Lys Ser Lys Phe Thr Gly Val Asn Phe
115 120 125
cct gcc gat ggt cct atc atg caa aac caa agt gtt gat tgg gag cca 432
Pro Ala Asp Gly Pro Ile Met Gln Asn Gln Ser Val Asp Trp Glu Pro
130 135 140
tca acc gag aaa att act gcc agc gac gga gtt ctg aag ggt gat gtt 480
Ser Thr Glu Lys Ile Thr Ala Ser Asp Gly Val Leu Lys Gly Asp Val
145 150 155 160
acg atg tac cta aaa ctt gaa gga ggc ggc aat cac aaa tgc caa ttc 528
Thr Met Tyr Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Asn His Lys Cys Gln Phe
165 170 175
aag act act tac aag gcg gca aaa aag att ctt aaa atg cca gga agc 576
Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Lys Ile Leu Lys Met Pro Gly Ser
180 185 190
cat tac atc agc cat cgc ctc gtc agg aaa acc gaa ggc aac att act 624
His Tyr Ile Ser His Arg Leu Val Arg Lys Thr Glu Gly Asn Ile Thr

195 200 205
gag ctg gta gaa gat gca gta gct cat tcc tga 657
Glu Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Ser
210 215
<210> 3
<211> 218
<212> PRT
<213> Fungia sp.
<400> 3
Met Val Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys Met Arg Tyr Tyr Met Asp
1 5 10 15
Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly Glu Gly Thr Gly
20 25 30
Arg Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Met Thr Leu Arg Val Thr Met Ala
35 40 45
Lys Gly Gly Pro Met Pro Phe Ala Phe Asp Leu Val Ser His Val Phe
50 55 60
Cys Tyr Gly His Arg Cys Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Glu Ile Pro Asp
65 70 75 80
Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu Ser Trp Glu Arg Ser Leu
85 90 95
Glu Phe Glu Asp Gly Gly Ser Ala Ser Val Ser Ala His Ile Ser Leu
100 105 110
Arg Gly Asn Thr Phe Tyr His Lys Ser Lys Phe Thr Gly Val Asn Phe
115 120 125
Pro Ala Asp Gly Pro Ile Met Gln Asn Gln Ser Val Asp Trp Glu Pro
130 135 140

Ser Thr Glu Lys Ile Thr Ala Ser Asp Gly Val Leu Lys Gly Asp Asp
 145 150 155 160
 Thr Leu Tyr Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Asn His Lys Cys Gln Met
 165 170 175
 Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Lys Ile Leu Lys Met Pro Gly Ser
 180 185 190
 His Tyr Ile Ser His Arg Leu Val Arg Lys Thr Glu Gly Asn Ile Thr
 195 200 205
 Glu Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Ser
 210 215

<210> 4

<211> 657

<212> DNA

<213> *Fungia* sp.

<400> 4

atg gtg agt gtg att aaa cca gag atg aag atg agg tac tac atg gac 48
 Met Val Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys Met Arg Tyr Tyr Met Asp
 1 5 10 15
 ggc tcc gtc aat ggg cat gag ttc aca att gaa ggt gaa ggc aca ggc 96
 Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly Glu Gly Thr Gly
 20 25 30
 aga cct tac gag gga cat caa gag atg aca cta cgc gtc aca atg gcc 144
 Arg Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Met Thr Leu Arg Val Thr Met Ala
 35 40 45
 aag ggc ggg cca atg cct ttc gcg ttt gac tta gtg tca cac gtg ttc 192
 Lys Gly Gly Pro Met Pro Phe Ala Phe Asp Leu Val Ser His Val Phe
 50 55 60

tgc tac ggc cac aga tgt ttt act aaa tat cca gaa gag ata cca gac 240
 Cys Tyr Gly His Arg Cys Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Glu Ile Pro Asp
 65 70 75 80
 tat ttc aaa caa gca ttt cct gaa ggc ctg tca tgg gaa agg tcg ttg 288
 Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu Ser Trp Glu Arg Ser Leu
 85 90 95
 gag ttc gaa gat ggt ggg tcc gct tca gtc agt gcg cat ata agc ctt 336
 Glu Phe Glu Asp Gly Gly Ser Ala Ser Val Ser Ala His Ile Ser Leu
 100 105 110
 aga gga aac acc ttc tac cac aaa tcc aaa ttt act ggg gtt aac ttt 384
 Arg Gly Asn Thr Phe Tyr His Lys Ser Lys Phe Thr Gly Val Asn Phe
 115 120 125
 cct gcc gat ggt cct atc atg caa aac caa agt gtt gat tgg gag cca 432
 Pro Ala Asp Gly Pro Ile Met Gln Asn Gln Ser Val Asp Trp Glu Pro
 130 135 140
 tca acc gag aaa att act gcc agc gac gga gtt ctg aag ggt gat gac 480
 Ser Thr Glu Lys Ile Thr Ala Ser Asp Gly Val Leu Lys Gly Asp Asp
 145 150 155 160
 acg ttg tac cta aaa ctt gaa gga ggc ggc aat cac aaa tgc caa atg 528
 Thr Leu Tyr Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Asn His Lys Cys Gln Met
 165 170 175
 aag act act tac aag gcg gca aaa aag att ctt aaa atg cca gga agc 576
 Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Lys Ile Leu Lys Met Pro Gly Ser
 180 185 190
 cat tac atc agc cat cgc ctc gtc agg aaa acc gaa ggc aac att act 624
 His Tyr Ile Ser His Arg Leu Val Arg Lys Thr Glu Gly Asn Ile Thr
 195 200 205

gag ctg gta gaa gat gca gta gct cat tcc taa

657

Glu Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Ser

210

215

<210> 5

<211> 218

<212> PRT

<213> Fungia sp.

<400> 5

Met Val Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys Met Arg Tyr Tyr Met Asp

1

5

10

15

Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly Glu Gly Thr Gly

20

25

30

Arg Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Met Thr Leu Arg Val Thr Met Ala

35

40

45

Lys Gly Gly Pro Met Pro Phe Ala Phe Asp Leu Val Ser His Val Phe

50

55

60

Gly Tyr Gly His Arg Gly Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Glu Ile Pro Asp

65

70

75

80

Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu Ser Trp Glu Arg Ser Leu

85

90

95

Glu Phe Glu Asp Gly Gly Ser Ala Ser Val Ser Ala His Ile Ser Leu

100

105

110

Arg Gly Asn Thr Phe Tyr His Lys Ser Lys Phe Thr Gly Val Asn Phe

115

120

125

Pro Ala Asp Gly Pro Ile Met Gln Asn Gln Ser Val Asp Trp Glu Pro

130

135

140

Ser Thr Glu Lys Ile Thr Ala Ser Asp Gly Val Leu Lys Gly Asp Asp

145 150 155 160
 Thr Met Tyr Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Asn His Lys Cys Gln Met
 165 170 175
 Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Lys Ile Leu Lys Met Pro Gly Ser
 180 185 190
 His Tyr Ile Ser His Arg Leu Val Arg Lys Thr Glu Gly Asn Ile Thr
 195 200 205
 Glu Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Ser
 210 215

<210> 6

<211> 657

<212> DNA

<213> *Fungia* sp.

<400> 6

atg gtg agt gtg att aaa cca gag atg aag atg agg tac tac atg gac 48
 Met Val Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys Met Arg Tyr Tyr Met Asp
 1 5 10 15
 ggc tcc gtc aat ggg cat gag ttc aca att gaa ggt gaa ggc aca ggc 96
 Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly Glu Gly Thr Gly
 20 25 30
 aga cct tac gag gga cat caa gag atg aca cta cgc gtc aca atg gcc 144
 Arg Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Met Thr Leu Arg Val Thr Met Ala
 35 40 45
 aag ggc ggg cca atg cct ttc gcg ttt gac tta gtg tca cac gtg ttc 192
 Lys Gly Gly Pro Met Pro Phe Ala Phe Asp Leu Val Ser His Val Phe
 50 55 60
 ggg tac ggc cac aga ggt ttt act aaa tat cca gaa gag ata cca gac 240

Gly Tyr Gly His Arg Gly Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Glu Ile Pro Asp
 65 70 75 80
 tat ttc aaa caa gca ttt cct gaa ggc ctg tca tgg gaa agg tcg ttg 288
 Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu Ser Trp Glu Arg Ser Leu
 85 90 95
 gag ttc gaa gat ggt ggg tcc gct tca gtc agt gcg cat ata agc ctt 336
 Glu Phe Glu Asp Gly Gly Ser Ala Ser Val Ser Ala His Ile Ser Leu
 100 105 110
 aga gga aac acc ttc tac cac aaa tcc aaa ttt act ggg gtt aac ttt 384
 Arg Gly Asn Thr Phe Tyr His Lys Ser Lys Phe Thr Gly Val Asn Phe
 115 120 125
 cct gcc gat ggt cct atc atg caa aac caa agt gtt gat tgg gag cca 432
 Pro Ala Asp Gly Pro Ile Met Gln Asn Gln Ser Val Asp Trp Glu Pro
 130 135 140
 tca acc gag aaa att act gcc agc gac gga gtt ctg aag ggt gat gat 480
 Ser Thr Glu Lys Ile Thr Ala Ser Asp Gly Val Leu Lys Gly Asp Asp
 145 150 155 160
 acg atg tac cta aaa ctt gaa gga ggc ggc aat cac aaa tgc caa atg 528
 Thr Met Tyr Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Asn His Lys Cys Gln Met
 165 170 175
 aag act act tac aag gcg gca aaa aag att ctt aaa atg cca gga agc 576
 Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Lys Ile Leu Lys Met Pro Gly Ser
 180 185 190
 cat tac atc agc cat cgc ctc gtc agg aaa acc gaa ggc aac att act 624
 His Tyr Ile Ser His Arg Leu Val Arg Lys Thr Glu Gly Asn Ile Thr
 195 200 205
 gag ctg gta gaa gat gca gta gct cat tcc taa 657

Glu Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Ser

210

215

<210> 7

<211> 218

<212> PRT

<213> Fungia sp.

<400> 7

Met Val Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys Met Arg Tyr Tyr Met Asp

1

5

10

15

Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly Glu Gly Thr Gly

20

25

30

Arg Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Met Thr Leu Arg Val Thr Met Ala

35

40

45

Lys Gly Gly Pro Met Pro Phe Ala Phe Asp Leu Val Ser His Val Phe

50

55

60

Ala Tyr Gly His Arg Gly Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Glu Ile Pro Asp

65

70

75

80

Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu Ser Trp Glu Arg Ser Leu

85

90

95

Glu Phe Glu Asp Gly Gly Ser Ala Ser Val Ser Ala His Ile Ser Leu

100

105

110

Arg Gly Asn Thr Phe Tyr His Lys Ser Lys Phe Thr Gly Val Asn Phe

115

120

125

Pro Ala Asp Gly Pro Ile Met Gln Asn Gln Ser Val Asp Trp Glu Pro

130

135

140

Ser Thr Glu Lys Ile Thr Ala Ser Asp Gly Val Leu Lys Gly Asp Val

145

150

155

160

Thr Met Tyr Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Asn His Lys Cys Gln Phe

165

170

175

Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Lys Ile Leu Lys Met Pro Gly Ser

180

185

190

His Tyr Ile Ser His Arg Leu Val Arg Lys Thr Glu Gly Asn Ile Thr

195

200

205

Glu Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Ser

210

215

<210> 8

<211> 657

<212> DNA

<213> Fungia sp.

<400> 8

atg gtg agt gtg att aaa cca gag atg aag atg agg tac tac atg gac 48

Met Val Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys Met Arg Tyr Tyr Met Asp

1

5

10

15

ggc tcc gtc aat ggg cat gag ttc aca att gaa ggt gaa ggc aca ggc 96

Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly Glu Gly Thr Gly

20

25

30

aga cct tac gag gga cat caa gag atg aca cta cgc gtc aca atg gcc 144

Arg Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Met Thr Leu Arg Val Thr Met Ala

35

40

45

aag ggc ggg cca atg cct ttc gcg ttt gac tta gtg tca cac gtg ttc 192

Lys Gly Gly Pro Met Pro Phe Ala Phe Asp Leu Val Ser His Val Phe

50

55

60

gct tac ggc cac aga ggt ttt act aaa tat cca gaa gag ata cca gac 240

Ala Tyr Gly His Arg Gly Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Glu Ile Pro Asp

65 70 75 80
tat ttc aaa caa gca ttt cct gaa ggc ctg tca tgg gaa agg tcg ttg 288
Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu Ser Trp Glu Arg Ser Leu
 85 90 95
gag ttc gaa gat ggt ggg tcc gct tca gtc agt gcg cat ata agc ctt 336
Glu Phe Glu Asp Gly Gly Ser Ala Ser Val Ser Ala His Ile Ser Leu
 100 105 110
aga gga aac acc ttc tac cac aaa tcc aaa ttt act ggg gtt aac ttt 384
Arg Gly Asn Thr Phe Tyr His Lys Ser Lys Phe Thr Gly Val Asn Phe
 115 120 125
cct gcc gat ggt cct atc atg caa aac caa agt gtt gat tgg gag cca 432
Pro Ala Asp Gly Pro Ile Met Gln Asn Gln Ser Val Asp Trp Glu Pro
 130 135 140
tca acc gag aaa att act gcc agc gac gga gtt ctg aag ggt gat gtt 480
Ser Thr Glu Lys Ile Thr Ala Ser Asp Gly Val Leu Lys Gly Asp Val
145 150 155 160
acg atg tac cta aaa ctt gaa gga ggc ggc aat cac aaa tgc caa ttc 528
Thr Met Tyr Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Asn His Lys Cys Gln Phe
 165 170 175
aag act act tac aag gcg gca aaa aag att ctt aaa atg cca gga agc 576
Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Lys Ile Leu Lys Met Pro Gly Ser
 180 185 190
cat tac atc agc cat cgc ctc gtc agg aaa acc gaa ggc aac att act 624
His Tyr Ile Ser His Arg Leu Val Arg Lys Thr Glu Gly Asn Ile Thr
 195 200 205
gag ctg gta gaa gat gca gta gct cat tcc taa 657
Glu Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Ser

210

215

<210> 9

<211> 218

<212> PRT

<213> Fungia sp.

<400> 9

Met Val Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys Met Arg Tyr Tyr Met Asp

1

5

10

15

Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly Glu Gly Thr Gly

20

25

30

Arg Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Leu Thr Leu Arg Val Thr Met Ala

35

40

45

Glu Gly Gly Pro Met Pro Phe Ala Phe Asp Leu Val Ser His Val Phe

50

55

60

Cys Tyr Gly His Lys Pro Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Glu Ile Pro Asp

65

70

75

80

Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu Ser Trp Glu Arg Ser Leu

85

90

95

Glu Phe Glu Asp Gly Gly Ser Ala Ser Val Ser Ala His Ile Ser Leu

100

105

110

Arg Gly Asn Thr Phe Tyr His Lys Ser Lys Phe Thr Gly Val Asn Phe

115

120

125

Pro Ala Asp Gly Pro Ile Met Gln Asn Gln Ser Val Asp Trp Glu Pro

130

135

140

Trp Thr Glu Lys Ile Thr Ala Ser Asp Gly Val Leu Lys Gly Asp Val

145

150

155

160

Thr Met Tyr Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Asn His Lys Cys Gln Phe

165 170 175
 Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Glu Ile Leu Glu Met Pro Gly Asp
 180 185 190
 His Tyr Ile Ser His Arg Leu Val Arg Lys Thr Glu Gly Asn Ile Thr
 195 200 205
 Glu Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Ser
 210 215
 <210> 10
 <211> 657
 <212> DNA
 <213> *Fungia* sp.
 <400> 10
 atg gtg agt gtg att aaa cca gag atg aag atg agg tac tac atg gac 48
 Met Val Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys Met Arg Tyr Tyr Met Asp
 1 5 10 15
 ggc tcc gtc aat ggg cat gag ttc aca att gaa ggt gaa ggc aca ggc 96
 Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly Glu Gly Thr Gly
 20 25 30
 aga cct tac gag gga cat caa gag ctg aca cta cgc gtc aca atg gcc 144
 Arg Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Leu Thr Leu Arg Val Thr Met Ala
 35 40 45
 gag ggc ggg cca atg cct ttc gcg ttt gac tta gtg tca cac gtg ttc 192
 Glu Gly Gly Pro Met Pro Phe Ala Phe Asp Leu Val Ser His Val Phe
 50 55 60
 tgt tac ggc cac aaa cct ttt act aaa tat cca gaa gag ata cca gac 240
 Cys Tyr Gly His Lys Pro Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Glu Ile Pro Asp
 65 70 75 80

tat ttc aaa caa gca ttt cct gaa ggc ctg tca tgg gaa agg tcg ttg 288

Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu Ser Trp Glu Arg Ser Leu

85

90

95

gag ttc gaa gat ggt ggg tcc gct tca gtc agt gcg cat ata agc ctt 336

Glu Phe Glu Asp Gly Gly Ser Ala Ser Val Ser Ala His Ile Ser Leu

100

105

110

aga gga aac acc ttc tac cac aaa tcc aaa ttt act ggg gtt aac ttt 384

Arg Gly Asn Thr Phe Tyr His Lys Ser Lys Phe Thr Gly Val Asn Phe

115

120

125

cct gcc gat ggt cct atc atg caa aac caa agt gtt gat tgg gag cca 432

Pro Ala Asp Gly Pro Ile Met Gln Asn Gln Ser Val Asp Trp Glu Pro

130

135

140

tgg acc gag aaa att act gcc agc gac gga gtt ctg aag ggt gat gtt 480

Trp Thr Glu Lys Ile Thr Ala Ser Asp Gly Val Leu Lys Gly Asp Val

145

150

155

160

acg atg tac cta aaa ctt gaa gga ggc ggc aat cac aaa tgc caa ttc 528

Thr Met Tyr Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Asn His Lys Cys Gln Phe

165

170

175

aag act act tac aag gcg gca aaa gag att ctt gaa atg cca gga gac 576

Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Glu Ile Leu Glu Met Pro Gly Asp

180

185

190

cat tac atc agc cat cgc ctc gtc agg aaa acc gaa ggc aac att act 624

His Tyr Ile Ser His Arg Leu Val Arg Lys Thr Glu Gly Asn Ile Thr

195

200

205

gag ctg gta gaa gat gca gta gct cat tcc taa

657

Glu Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Ser

210

215

<210> 11

<211> 218

<212> PRT

<213> Fungia sp.

<400> 11

Met	Val	Ser	Val	Ile	Lys	Pro	Glu	Met	Lys	Met	Arg	Tyr	Tyr	Met	Asp
1				5					10					15	
Gly	Ser	Val	Asn	Gly	His	Glu	Phe	Thr	Ile	Glu	Gly	Glu	Gly	Thr	Gly
			20					25					30		
Arg	Pro	Tyr	Glu	Gly	His	Gln	Glu	Met	Thr	Leu	Arg	Val	Thr	Met	Ala
		35				40					45				
Glu	Gly	Gly	Pro	Met	Pro	Phe	Ala	Phe	Asp	Leu	Val	Ser	His	Val	Phe
	50					55				60					
Cys	Tyr	Gly	His	Arg	Gly	Phe	Thr	Lys	Tyr	Pro	Glu	Glu	Ile	Pro	Asp
65				70					75					80	
Tyr	Phe	Lys	Gln	Ala	Phe	Pro	Glu	Gly	Leu	Ser	Trp	Glu	Arg	Ser	Leu
			85					90					95		
Glu	Phe	Glu	Asp	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Val	Ser	Ala	His	Ile	Ser	Leu
			100					105					110		
Arg	Gly	Asn	Thr	Phe	Tyr	His	Lys	Ser	Lys	Phe	Thr	Gly	Val	Asn	Phe
		115					120					125			
Pro	Ala	Asp	Gly	Pro	Ile	Met	Gln	Asn	Gln	Ser	Val	Asp	Trp	Glu	Pro
	130					135					140				
Ser	Thr	Glu	Lys	Ile	Thr	Ala	Ser	Asp	Gly	Val	Leu	Lys	Gly	Asp	Val
145				150					155					160	
Thr	Met	Tyr	Leu	Lys	Leu	Glu	Gly	Gly	Gly	Asn	His	Lys	Cys	Gln	Phe
			165					170					175		

Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Glu Ile Leu Glu Met Pro Gly Asp

180

185

190

His Tyr Ile Gly His Arg Leu Val Arg Lys Thr Glu Gly Asn Ile Thr

195

200

205

Glu Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Ser

210

215

<210> 12

<211> 657

<212> DNA

<213> *Fungia* sp.

<400> 12

atg gtg agt gtg att aaa cca gag atg aag atg agg tac tac atg gac 48

Met Val Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys Met Arg Tyr Tyr Met Asp

1

5

10

15

ggc tcc gtc aat ggg cat gag ttc aca att gaa ggt gaa ggc aca ggc 96

Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly Glu Gly Thr Gly

20

25

30

aga cct tac gag gga cat caa gag atg aca cta cgc gtc aca atg gcc 144

Arg Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Met Thr Leu Arg Val Thr Met Ala

35

40

45

gag ggc ggg cca atg cct ttc gcg ttt gac tta gtg tca cac gtg ttc 192

Glu Gly Gly Pro Met Pro Phe Ala Phe Asp Leu Val Ser His Val Phe

50

55

60

tgt tac ggc cac aga ggt ttt act aaa tat cca gaa gag ata cca gac 240

Cys Tyr Gly His Arg Gly Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Glu Ile Pro Asp

65

70

75

80

tat ttc aaa caa gca ttt cct gaa ggc ctg tca tgg gaa agg tcg ttg 288

Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu Ser Trp Glu Arg Ser Leu
 85 90 95
 gag ttc gaa gat ggt ggg tcc gct tca gtc agt gcg cat ata agc ctt 336
 Glu Phe Glu Asp Gly Gly Ser Ala Ser Val Ser Ala His Ile Ser Leu
 100 105 110
 aga gga aac acc ttc tac cac aaa tcc aaa ttt act ggg gtt aac ttt 384
 Arg Gly Asn Thr Phe Tyr His Lys Ser Lys Phe Thr Gly Val Asn Phe
 115 120 125
 cct gcc gat ggt cct atc atg caa aac caa agt gtt gat tgg gag cca 432
 Pro Ala Asp Gly Pro Ile Met Gln Asn Gln Ser Val Asp Trp Glu Pro
 130 135 140
 tca acc gag aaa att act gcc agc gac gga gtt ctg aag ggt gat gtt 480
 Ser Thr Glu Lys Ile Thr Ala Ser Asp Gly Val Leu Lys Gly Asp Val
 145 150 155 160
 acg atg tac cta aaa ctt gaa gga ggc ggc aat cac aaa tgc caa ttc 528
 Thr Met Tyr Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Asn His Lys Cys Gln Phe
 165 170 175
 aag act act tac aag gcg gca aaa gag att ctt gaa atg cca gga gac 576
 Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Glu Ile Leu Glu Met Pro Gly Asp
 180 185 190
 cat tac atc ggc cat cgc ctc gtc agg aaa acc gaa ggc aac att act 624
 His Tyr Ile Gly His Arg Leu Val Arg Lys Thr Glu Gly Asn Ile Thr
 195 200 205
 gag ctg gta gaa gat gca gta gct cat tcc taa 657
 Glu Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Ser
 210 215
 <210> 13

<211> 218

<212> PRT

<213> Fungia sp.

<400> 13

Met	Val	Ser	Val	Ile	Lys	Pro	Glu	Met	Lys	Met	Arg	Tyr	Tyr	Met	Asp
1				5					10					15	
Gly	Ser	Val	Asn	Gly	His	Glu	Phe	Thr	Ile	Glu	Gly	Glu	Gly	Thr	Gly
			20					25					30		
Arg	Pro	Tyr	Glu	Gly	His	Gln	Glu	Met	Thr	Leu	Arg	Val	Thr	Met	Ala
		35					40					45			
Glu	Gly	Gly	Pro	Met	Pro	Phe	Ala	Phe	Asp	Leu	Val	Ser	His	Val	Phe
	50					55					60				
Cys	Tyr	Gly	His	Arg	Ala	Phe	Thr	Lys	Tyr	Pro	Glu	Glu	Ile	Pro	Asp
65				70					75					80	
Tyr	Phe	Lys	Gln	Ala	Phe	Pro	Glu	Gly	Leu	Ser	Trp	Glu	Arg	Ser	Leu
			85					90					95		
Glu	Phe	Glu	Asp	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Val	Ser	Ala	His	Ile	Ser	Leu
		100						105					110		
Arg	Gly	Asn	Thr	Phe	Tyr	His	Lys	Ser	Lys	Phe	Thr	Gly	Val	Asn	Phe
		115					120					125			
Pro	Ala	Asp	Gly	Pro	Ile	Met	Gln	Asn	Gln	Ser	Val	Asp	Trp	Glu	Pro
	130					135					140				
Ser	Thr	Glu	Lys	Ile	Thr	Ala	Ser	Asp	Gly	Val	Leu	Lys	Gly	Asp	Val
145				150						155				160	
Thr	Met	Tyr	Leu	Lys	Leu	Glu	Gly	Gly	Gly	Asn	His	Lys	Cys	Gln	Phe
				165				170					175		
Lys	Thr	Thr	Tyr	Lys	Ala	Ala	Lys	Glu	Ile	Leu	Glu	Met	Pro	Gly	Asp

180 185 190
 His Tyr Ile Gly His Arg Leu Val Arg Lys Thr Glu Gly Asn Ile Thr
 195 200 205
 Glu Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Ser
 210 215
 <210> 14
 <211> 657
 <212> DNA
 <213> *Fungia* sp.
 <400> 14
 atg gtg agt gtg att aaa cca gag atg aag atg agg tac tac atg gac 48
 Met Val Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys Met Arg Tyr Tyr Met Asp
 1 5 10 15
 ggc tcc gtc aat ggg cat gag ttc aca att gaa ggt gaa ggc aca ggc 96
 Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly Glu Gly Thr Gly
 20 25 30
 aga cct tac gag gga cat caa gag atg aca cta cgc gtc aca atg gcc 144
 Arg Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Met Thr Leu Arg Val Thr Met Ala
 35 40 45
 gag ggc ggg cca atg cct ttc gcg ttt gac tta gtg tca cac gtg ttc 192
 Glu Gly Gly Pro Met Pro Phe Ala Phe Asp Leu Val Ser His Val Phe
 50 55 60
 tgt tac ggc cac aga gct ttt act aaa tat cca gaa gag ata cca gac 240
 Cys Tyr Gly His Arg Ala Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Glu Ile Pro Asp
 65 70 75 80
 tat ttc aaa caa gca ttt cct gaa ggc ctg tca tgg gaa agg tcg ttg 288
 Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu Ser Trp Glu Arg Ser Leu

85 90 95
gag ttc gaa gat ggt ggg tcc gct tca gtc agt gcg cat ata agc ctt 336
Glu Phe Glu Asp Gly Gly Ser Ala Ser Val Ser Ala His Ile Ser Leu
100 105 110
aga gga aac acc ttc tac cac aaa tcc aaa ttt act ggg gtt aac ttt 384
Arg Gly Asn Thr Phe Tyr His Lys Ser Lys Phe Thr Gly Val Asn Phe
115 120 125
cct gcc gat ggt cct atc atg caa aac caa agt gtt gat tgg gag cca 432
Pro Ala Asp Gly Pro Ile Met Gln Asn Gln Ser Val Asp Trp Glu Pro
130 135 140
tca acc gag aaa att act gcc agc gac gga gtt ctg aag ggt gat gtt 480
Ser Thr Glu Lys Ile Thr Ala Ser Asp Gly Val Leu Lys Gly Asp Val
145 150 155 160
acg atg tac cta aaa ctt gaa gga ggc ggc aat cac aaa tgc caa ttc 528
Thr Met Tyr Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Asn His Lys Cys Gln Phe
165 170 175
aag act act tac aag gcg gca aaa gag att ctt gaa atg cca gga gac 576
Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Glu Ile Leu Glu Met Pro Gly Asp
180 185 190
cat tac atc ggg cat cgc ctc gtc agg aaa acc gaa ggc aac att act 624
His Tyr Ile Gly His Arg Leu Val Arg Lys Thr Glu Gly Asn Ile Thr
195 200 205
gag ctg gta gaa gat gca gta gct cat tcc taa 657
Glu Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Ser
210 215

<210> 15

<211> 218

<212> PRT

<213> Fungia sp.

<400> 15

Met	Val	Ser	Val	Ile	Lys	Pro	Glu	Met	Lys	Met	Arg	Tyr	Tyr	Met	Asp
1				5					10					15	
Gly	Ser	Val	Asn	Gly	His	Glu	Phe	Thr	Ile	Glu	Gly	Glu	Gly	Thr	Gly
			20					25					30		
Arg	Pro	Tyr	Glu	Gly	His	Gln	Glu	Met	Thr	Leu	Arg	Val	Thr	Met	Ala
		35					40					45			
Glu	Gly	Gly	Pro	Met	Pro	Phe	Ala	Phe	Asp	Leu	Val	Ser	His	Val	Phe
	50					55					60				
Cys	Tyr	Gly	His	Arg	Ser	Phe	Thr	Lys	Tyr	Pro	Glu	Glu	Ile	Pro	Asp
65					70				75					80	
Tyr	Phe	Lys	Gln	Ala	Phe	Pro	Glu	Gly	Leu	Ser	Trp	Glu	Arg	Ser	Leu
			85					90					95		
Glu	Phe	Glu	Asp	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Val	Ser	Ala	His	Ile	Ser	Leu
		100						105					110		
Arg	Gly	Asn	Thr	Phe	Tyr	His	Lys	Ser	Lys	Phe	Thr	Gly	Val	Asn	Phe
		115					120					125			
Pro	Ala	Asp	Gly	Pro	Ile	Met	Gln	Asn	Gln	Ser	Val	Asp	Trp	Glu	Pro
	130					135					140				
Ser	Thr	Glu	Lys	Ile	Thr	Ala	Ser	Asp	Gly	Val	Leu	Lys	Gly	Asp	Val
145				150					155					160	
Thr	Met	Tyr	Leu	Lys	Leu	Glu	Gly	Gly	Gly	Asn	His	Lys	Cys	Gln	Phe
				165				170					175		
Lys	Thr	Thr	Tyr	Lys	Ala	Ala	Lys	Glu	Ile	Leu	Glu	Met	Pro	Gly	Asp
			180					185					190		

His Tyr Ile Gly His Arg Leu Val Arg Lys Thr Glu Gly Asn Ile Thr

195

200

205

Glu Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Ser

210

215

<210> 16

<211> 657

<212> DNA

<213> *Fungia* sp.

<400> 16

atg gtg agt gtg att aaa cca gag atg aag atg agg tac tac atg gac 48

Met Val Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys Met Arg Tyr Tyr Met Asp

1

5

10

15

ggc tcc gtc aat ggg cat gag ttc aca att gaa ggt gaa ggc aca ggc 96

Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly Glu Gly Thr Gly

20

25

30

aga cct tac gag gga cat caa gag atg aca cta cgc gtc aca atg gcc 144

Arg Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Met Thr Leu Arg Val Thr Met Ala

35

40

45

gag ggc ggg cca atg cct ttc gcg ttt gac tta gtg tca cac gtg ttc 192

Glu Gly Gly Pro Met Pro Phe Ala Phe Asp Leu Val Ser His Val Phe

50

55

60

tgt tac ggc cac aga tct ttt act aaa tat cca gaa gag ata cca gac 240

Cys Tyr Gly His Arg Ser Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Glu Ile Pro Asp

65

70

75

80

tat ttc aaa caa gca ttt cct gaa ggc ctg tca tgg gaa agg tcg ttg 288

Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu Ser Trp Glu Arg Ser Leu

85

90

95

gag ttc gaa gat ggt ggg tcc gct tca gtc agt gcg cat ata agc ctt 336
 Glu Phe Glu Asp Gly Gly Ser Ala Ser Val Ser Ala His Ile Ser Leu
 100 105 110
 aga gga aac acc ttc tac cac aaa tcc aaa ttt act ggg gtt aac ttt 384
 Arg Gly Asn Thr Phe Tyr His Lys Ser Lys Phe Thr Gly Val Asn Phe
 115 120 125
 cct gcc gat ggt cct atc atg caa aac caa agt gtt gat tgg gag cca 432
 Pro Ala Asp Gly Pro Ile Met Gln Asn Gln Ser Val Asp Trp Glu Pro
 130 135 140
 tca acc gag aaa att act gcc agc gac gga gtt ctg aag ggt gat gtt 480
 Ser Thr Glu Lys Ile Thr Ala Ser Asp Gly Val Leu Lys Gly Asp Val
 145 150 155 160
 acg atg tac cta aaa ctt gaa gga ggc ggc aat cac aaa tgc caa ttc 528
 Thr Met Tyr Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Asn His Lys Cys Gln Phe
 165 170 175
 aag act act tac aag gcg gca aaa gag att ctt gaa atg cca gga gac 576
 Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Glu Ile Leu Glu Met Pro Gly Asp
 180 185 190
 cat tac atc ggc cat cgc ctc gtc agg aaa acc gaa ggc aac att act 624
 His Tyr Ile Gly His Arg Leu Val Arg Lys Thr Glu Gly Asn Ile Thr
 195 200 205
 gag ctg gta gaa gat gca gta gct cat tcc taa 657
 Glu Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Ser
 210 215

<210> 17

<211> 218

<212> PRT

<213> Fungia sp.

<400> 17

Met Val Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys Met Arg Tyr Tyr Met Asp
 1 5 10 15
 Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly Glu Gly Thr Gly
 20 25 30
 Arg Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Met Thr Leu Arg Val Thr Met Ala
 35 40 45
 Glu Gly Gly Pro Met Pro Phe Ala Phe Asp Leu Val Ser His Val Phe
 50 55 60
 Cys Tyr Gly His Arg Cys Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Glu Ile Pro Asp
 65 70 75 80
 Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu Ser Trp Glu Arg Ser Leu
 85 90 95
 Glu Phe Glu Asp Gly Gly Ser Ala Ser Val Ser Ala His Ile Ser Leu
 100 105 110
 Arg Gly Asn Thr Phe Tyr His Lys Ser Lys Phe Thr Gly Val Asn Phe
 115 120 125
 Pro Ala Asp Gly Pro Ile Met Gln Asn Gln Ser Val Asp Trp Glu Pro
 130 135 140
 Ser Thr Glu Lys Ile Thr Ala Ser Asp Gly Val Leu Lys Gly Asp Val
 145 150 155 160
 Thr Met Tyr Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Asn His Lys Cys Gln Phe
 165 170 175
 Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Glu Ile Leu Glu Met Pro Gly Asp
 180 185 190
 His Tyr Ile Gly His Arg Leu Val Arg Lys Thr Glu Gly Asn Ile Thr

195 200 205
 Glu Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Ser
 210 215
 <210> 18
 <211> 657
 <212> DNA
 <213> *Fungia* sp.
 <400> 18
 atg gtg agt gtg att aaa cca gag atg aag atg agg tac tac atg gac 48
 Met Val Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys Met Arg Tyr Tyr Met Asp
 1 5 10 15
 ggc tcc gtc aat ggg cat gag ttc aca att gaa ggt gaa ggc aca ggc 96
 Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly Glu Gly Thr Gly
 20 25 30
 aga cct tac gag gga cat caa gag atg aca cta cgc gtc aca atg gcc 144
 Arg Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Met Thr Leu Arg Val Thr Met Ala
 35 40 45
 gag ggc ggg cca atg cct ttc gcg ttt gac tta gtg tca cac gtg ttc 192
 Glu Gly Gly Pro Met Pro Phe Ala Phe Asp Leu Val Ser His Val Phe
 50 55 60
 tgt tac ggc cac aga tgt ttt act aaa tat cca gaa gag ata cca gac 240
 Cys Tyr Gly His Arg Cys Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Glu Ile Pro Asp
 65 70 75 80
 tat ttc aaa caa gca ttt cct gaa ggc ctg tca tgg gaa agg tcg ttg 288
 Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu Ser Trp Glu Arg Ser Leu
 85 90 95
 gag ttc gaa gat ggt ggg tcc gct tca gtc agt gcg cat ata agc ctt 336

Glu Phe Glu Asp Gly Gly Ser Ala Ser Val Ser Ala His Ile Ser Leu
 100 105 110
 aga gga aac acc ttc tac cac aaa tcc aaa ttt act ggg gtt aac ttt 384
 Arg Gly Asn Thr Phe Tyr His Lys Ser Lys Phe Thr Gly Val Asn Phe
 115 120 125
 cct gcc gat ggt cct atc atg caa aac caa agt gtt gat tgg gag cca 432
 Pro Ala Asp Gly Pro Ile Met Gln Asn Gln Ser Val Asp Trp Glu Pro
 130 135 140
 tca acc gag aaa att act gcc agc gac gga gtt ctg aag ggt gat gtt 480
 Ser Thr Glu Lys Ile Thr Ala Ser Asp Gly Val Leu Lys Gly Asp Val
 145 150 155 160
 acg atg tac cta aaa ctt gaa gga ggc ggc aat cac aaa tgc caa ttc 528
 Thr Met Tyr Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Asn His Lys Cys Gln Phe
 165 170 175
 aag act act tac aag gcg gca aaa gag att ctt gaa atg cca gga gac 576
 Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Glu Ile Leu Glu Met Pro Gly Asp
 180 185 190
 cat tac atc ggc cat cgc ctc gtc agg aaa acc gaa ggc aac att act 624
 His Tyr Ile Gly His Arg Leu Val Arg Lys Thr Glu Gly Asn Ile Thr
 195 200 205
 gag ctg gta gaa gat gca gta gct cat tcc taa 657
 Glu Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Ser
 210 215

<210> 19

<211> 218

<212> PRT

<213> Fungia sp.

<400> 19

Met	Val	Ser	Val	Ile	Lys	Pro	Glu	Met	Lys	Met	Arg	Tyr	Tyr	Met	Asp
1				5					10					15	
Gly	Ser	Val	Asn	Gly	His	Glu	Phe	Thr	Ile	Glu	Gly	Glu	Gly	Thr	Gly
			20					25					30		
Arg	Pro	Tyr	Glu	Gly	His	Gln	Glu	Met	Thr	Leu	Arg	Val	Thr	Met	Ala
		35					40					45			
Glu	Gly	Gly	Pro	Met	Pro	Phe	Ala	Phe	Asp	Leu	Val	Ser	His	Val	Phe
	50					55					60				
Cys	Tyr	Gly	His	Arg	Thr	Phe	Thr	Lys	Tyr	Pro	Glu	Glu	Ile	Pro	Asp
65				70					75					80	
Tyr	Phe	Lys	Gln	Ala	Phe	Pro	Glu	Gly	Leu	Ser	Trp	Glu	Arg	Ser	Leu
			85					90					95		
Glu	Phe	Glu	Asp	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Val	Ser	Ala	His	Ile	Ser	Leu
		100					105					110			
Arg	Gly	Asn	Thr	Phe	Tyr	His	Lys	Ser	Lys	Phe	Thr	Gly	Val	Asn	Phe
	115					120				125					
Pro	Ala	Asp	Gly	Pro	Ile	Met	Gln	Asn	Gln	Ser	Val	Asp	Trp	Glu	Pro
	130				135					140					
Ser	Thr	Glu	Lys	Ile	Thr	Ala	Ser	Asp	Gly	Val	Leu	Lys	Gly	Asp	Val
145			150						155				160		
Thr	Met	Tyr	Leu	Lys	Leu	Glu	Gly	Gly	Gly	Asn	His	Lys	Cys	Gln	Phe
			165					170				175			
Lys	Thr	Thr	Tyr	Lys	Ala	Ala	Lys	Glu	Ile	Leu	Glu	Met	Pro	Gly	Asp
		180					185				190				
His	Tyr	Ile	Gly	His	Arg	Leu	Val	Arg	Lys	Thr	Glu	Gly	Asn	Ile	Thr
	195					200					205				

Glu Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Ser

210

215

<210> 20

<211> 657

<212> DNA

<213> *Fungia* sp.

<400> 20

atg gtg agt gtg att aaa cca gag atg aag atg agg tac tac atg gac 48

Met Val Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys Met Arg Tyr Tyr Met Asp

1

5

10

15

ggc tcc gtc aat ggg cat gag ttc aca att gaa ggt gaa ggc aca ggc 96

Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly Glu Gly Thr Gly

20

25

30

aga cct tac gag gga cat caa gag atg aca cta cgc gtc aca atg gcc 144

Arg Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Met Thr Leu Arg Val Thr Met Ala

35

40

45

gag ggc ggg cca atg cct ttc gcg ttt gac tta gtg tca cac gtg ttc 192

Glu Gly Gly Pro Met Pro Phe Ala Phe Asp Leu Val Ser His Val Phe

50

55

60

tgt tac ggc cac aga act ttt act aaa tat cca gaa gag ata cca gac 240

Cys Tyr Gly His Arg Thr Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Glu Ile Pro Asp

65

70

75

80

tat ttc aaa caa gca ttt cct gaa ggc ctg tca tgg gaa agg tcg ttg 288

Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu Ser Trp Glu Arg Ser Leu

85

90

95

gag ttc gaa gat ggt ggg tcc gct tca gtc agt gcg cat ata agc ctt 336

Glu Phe Glu Asp Gly Gly Ser Ala Ser Val Ser Ala His Ile Ser Leu

100	105	110	
aga gga aac acc ttc tac cac	aaa tcc aaa ttt act	ggg gtt aac ttt	384
Arg Gly Asn Thr Phe Tyr His	Lys Ser Lys Phe Thr	Gly Val Asn Phe	
115	120	125	
cct gcc gat ggt cct atc atg	caa aac caa agt gtt	gat tgg gag cca	432
Pro Ala Asp Gly Pro Ile Met	Gln Asn Gln Ser Val	Asp Trp Glu Pro	
130	135	140	
tca acc gag aaa att act gcc	agc gac gga gtt ctg	aag ggt gat gtt	480
Ser Thr Glu Lys Ile Thr Ala	Ser Asp Gly Val Leu	Lys Gly Asp Val	
145	150	155	160
acg atg tac cta aaa ctt gaa	gga ggc ggc aat cac	aaa tgc caa ttc	528
Thr Met Tyr Leu Lys Leu Glu	Gly Gly Gly Asn His	Lys Cys Gln Phe	
165	170	175	
aag act act tac aag gcg gca	aaa gag att ctt gaa	atg cca gga gac	576
Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Ala	Lys Glu Ile Leu Glu	Met Pro Gly Asp	
180	185	190	
cat tac atc ggc cat cgc ctc	gtc agg aaa acc gaa	ggc aac att act	624
His Tyr Ile Gly His Arg Leu	Val Arg Lys Thr Glu	Gly Asn Ile Thr	
195	200	205	
gag ctg gta gaa gat gca gta	gct cat tcc taa		657
Glu Leu Val Glu Asp Ala Val	Ala His Ser		
210	215		

<210> 21

<211> 218

<212> PRT

<213> *Fungia* sp.

<400> 21

Met	Val	Ser	Val	Ile	Lys	Pro	Glu	Met	Lys	Met	Arg	Tyr	Tyr	Met	Asp
1				5					10					15	
Gly	Ser	Val	Asn	Gly	His	Glu	Phe	Thr	Ile	Glu	Gly	Glu	Gly	Thr	Gly
			20					25					30		
Arg	Pro	Tyr	Glu	Gly	His	Gln	Glu	Met	Thr	Leu	Arg	Val	Thr	Met	Ala
		35					40					45			
Glu	Gly	Gly	Pro	Met	Pro	Phe	Ala	Phe	Asp	Leu	Val	Ser	His	Val	Phe
	50					55					60				
Cys	Tyr	Gly	His	Arg	Val	Phe	Thr	Lys	Tyr	Pro	Glu	Glu	Ile	Pro	Asp
65				70						75				80	
Tyr	Phe	Lys	Gln	Ala	Phe	Pro	Glu	Gly	Leu	Ser	Trp	Glu	Arg	Ser	Leu
			85					90					95		
Glu	Phe	Glu	Asp	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Val	Ser	Ala	His	Ile	Ser	Leu
			100					105					110		
Arg	Gly	Asn	Thr	Phe	Tyr	His	Lys	Ser	Lys	Phe	Thr	Gly	Val	Asn	Phe
		115					120					125			
Pro	Ala	Asp	Gly	Pro	Ile	Met	Gln	Asn	Gln	Ser	Val	Asp	Trp	Glu	Pro
	130					135					140				
Ser	Thr	Glu	Lys	Ile	Thr	Ala	Ser	Asp	Gly	Val	Leu	Lys	Gly	Asp	Val
145				150						155				160	
Thr	Met	Tyr	Leu	Lys	Leu	Glu	Gly	Gly	Gly	Asn	His	Lys	Cys	Gln	Phe
			165					170					175		
Lys	Thr	Thr	Tyr	Lys	Ala	Ala	Lys	Glu	Ile	Leu	Glu	Met	Pro	Gly	Asp
			180					185					190		
His	Tyr	Ile	Gly	His	Arg	Leu	Val	Arg	Lys	Thr	Glu	Gly	Asn	Ile	Thr
		195					200						205		
Glu	Leu	Val	Glu	Asp	Ala	Val	Ala	His	Ser						

210

215

<210> 22

<211> 657

<212> DNA

<213> Fungia sp.

<400> 22

atg gtg agt gtg att aaa cca gag atg aag atg agg tac tac atg gac 48

Met Val Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys Met Arg Tyr Tyr Met Asp

1

5

10

15

ggc tcc gtc aat ggg cat gag ttc aca att gaa ggt gaa ggc aca ggc 96

Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly Glu Gly Thr Gly

20

25

30

aga cct tac gag gga cat caa gag atg aca cta cgc gtc aca atg gcc 144

Arg Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Met Thr Leu Arg Val Thr Met Ala

35

40

45

gag ggc ggg cca atg cct ttc gcg ttt gac tta gtg tca cac gtg ttc 192

Glu Gly Gly Pro Met Pro Phe Ala Phe Asp Leu Val Ser His Val Phe

50

55

60

tgt tac ggc cac aga gta ttt act aaa tat cca gaa gag ata cca gac 240

Cys Tyr Gly His Arg Val Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Glu Ile Pro Asp

65

70

75

80

tat ttc aaa caa gca ttt cct gaa ggc ctg tca tgg gaa agg tcg ttg 288

Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu Ser Trp Glu Arg Ser Leu

85

90

95

gag ttc gaa gat ggt ggg tcc gct tca gtc agt gcg cat ata agc ctt 336

Glu Phe Glu Asp Gly Gly Ser Ala Ser Val Ser Ala His Ile Ser Leu

100

105

110

aga gga aac acc ttc tac cac aaa tcc aaa ttt act ggg gtt aac ttt 384

Arg Gly Asn Thr Phe Tyr His Lys Ser Lys Phe Thr Gly Val Asn Phe

115

120

125

cct gcc gat ggt cct atc atg caa aac caa agt gtt gat tgg gag cca 432

Pro Ala Asp Gly Pro Ile Met Gln Asn Gln Ser Val Asp Trp Glu Pro

130

135

140

tca acc gag aaa att act gcc agc gac gga gtt ctg aag ggt gat gtt 480

Ser Thr Glu Lys Ile Thr Ala Ser Asp Gly Val Leu Lys Gly Asp Val

145

150

155

160

acg atg tac cta aaa ctt gaa gga ggc ggc aat cac aaa tgc caa ttc 528

Thr Met Tyr Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Asn His Lys Cys Gln Phe

165

170

175

aag act act tac aag gcg gca aaa gag att ctt gaa atg cca gga gac 576

Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Glu Ile Leu Glu Met Pro Gly Asp

180

185

190

cat tac atc ggc cat cgc ctc gtc agg aaa acc gaa ggc aac att act 624

His Tyr Ile Gly His Arg Leu Val Arg Lys Thr Glu Gly Asn Ile Thr

195

200

205

gag ctg gta gaa gat gca gta gct cat tcc taa

657

Glu Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Ser

210

215

<210> 23

<211> 218

<212> PRT

<213> *Fungia* sp.

<400> 23

Met Val Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys Met Arg Tyr Tyr Met Asp

1	5	10	15
Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly Glu Gly Thr Gly			
20	25	30	
Arg Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Met Thr Leu Arg Val Thr Met Ala			
35	40	45	
Glu Gly Gly Pro Met Pro Phe Ala Phe Asp Leu Val Ser His Val Phe			
50	55	60	
Cys Tyr Gly His Arg Leu Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Glu Ile Pro Asp			
65	70	75	80
Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu Ser Trp Glu Arg Ser Leu			
85	90	95	
Glu Phe Glu Asp Gly Gly Ser Ala Ser Val Ser Ala His Ile Ser Leu			
100	105	110	
Arg Gly Asn Thr Phe Tyr His Lys Ser Lys Phe Thr Gly Val Asn Phe			
115	120	125	
Pro Ala Asp Gly Pro Ile Met Gln Asn Gln Ser Val Asp Trp Glu Pro			
130	135	140	
Ser Thr Glu Lys Ile Thr Ala Ser Asp Gly Val Leu Lys Gly Asp Val			
145	150	155	160
Thr Met Tyr Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Asn His Lys Cys Gln Phe			
165	170	175	
Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Glu Ile Leu Glu Met Pro Gly Asp			
180	185	190	
His Tyr Ile Gly His Arg Leu Val Arg Lys Thr Glu Gly Asn Ile Thr			
195	200	205	
Glu Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Ser			
210	215		

<210> 24

<211> 657

<212> DNA

<213> Fungia sp.

<400> 24

atg gtg agt gtg att aaa cca gag atg aag atg agg tac tac atg gac 48
Met Val Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys Met Arg Tyr Tyr Met Asp
1 5 10 15
ggc tcc gtc aat ggg cat gag ttc aca att gaa ggt gaa ggc aca ggc 96
Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly Glu Gly Thr Gly
20 25 30
aga cct tac gag gga cat caa gag atg aca cta cgc gtc aca atg gcc 144
Arg Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Met Thr Leu Arg Val Thr Met Ala
35 40 45
gag ggc ggg cca atg cct ttc gcg ttt gac tta gtg tca cac gtg ttc 192
Glu Gly Gly Pro Met Pro Phe Ala Phe Asp Leu Val Ser His Val Phe
50 55 60
tgt tac ggc cac aga ctt ttt act aaa tat cca gaa gag ata cca gac 240
Cys Tyr Gly His Arg Leu Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Glu Ile Pro Asp
65 70 75 80
tat ttc aaa caa gca ttt cct gaa ggc ctg tca tgg gaa agg tcg ttg 288
Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu Ser Trp Glu Arg Ser Leu
85 90 95
gag ttc gaa gat ggt ggg tcc gct tca gtc agt gcg cat ata agc ctt 336
Glu Phe Glu Asp Gly Gly Ser Ala Ser Val Ser Ala His Ile Ser Leu
100 105 110
aga gga aac acc ttc tac cac aaa tcc aaa ttt act ggg gtt aac ttt 384

Arg Gly Asn Thr Phe Tyr His Lys Ser Lys Phe Thr Gly Val Asn Phe
 115 120 125
 cct gcc gat ggt cct atc atg caa aac caa agt gtt gat tgg gag cca 432
 Pro Ala Asp Gly Pro Ile Met Gln Asn Gln Ser Val Asp Trp Glu Pro
 130 135 140
 tca acc gag aaa att act gcc agc gac gga gtt ctg aag ggt gat gtt 480
 Ser Thr Glu Lys Ile Thr Ala Ser Asp Gly Val Leu Lys Gly Asp Val
 145 150 155 160
 acg atg tac cta aaa ctt gaa gga ggc ggc aat cac aaa tgc caa ttc 528
 Thr Met Tyr Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Asn His Lys Cys Gln Phe
 165 170 175
 aag act act tac aag gcg gca aaa gag att ctt gaa atg cca gga gac 576
 Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Glu Ile Leu Glu Met Pro Gly Asp
 180 185 190
 cat tac atc ggc cat cgc ctc gtc agg aaa acc gaa ggc aac att act 624
 His Tyr Ile Gly His Arg Leu Val Arg Lys Thr Glu Gly Asn Ile Thr
 195 200 205
 gag ctg gta gaa gat gca gta gct cat tcc taa 657
 Glu Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Ser
 210 215

<210> 25

<211> 218

<212> PRT

<213> Fungia sp.

<400> 25

Met Val Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys Met Arg Tyr Tyr Met Asp

1

5

10

15

Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly Glu Gly Thr Gly
 20 25 30
 Arg Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Met Thr Leu Arg Val Thr Met Ala
 35 40 45
 Glu Gly Gly Pro Met Pro Phe Ala Phe Asp Leu Val Ser His Val Phe
 50 55 60
 Cys Tyr Gly His Arg Tyr Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Glu Ile Pro Asp
 65 70 75 80
 Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu Ser Trp Glu Arg Ser Leu
 85 90 95
 Glu Phe Glu Asp Gly Gly Ser Ala Ser Val Ser Ala His Ile Ser Leu
 100 105 110
 Arg Gly Asn Thr Phe Tyr His Lys Ser Lys Phe Thr Gly Val Asn Phe
 115 120 125
 Pro Ala Asp Gly Pro Ile Met Gln Asn Gln Ser Val Asp Trp Glu Pro
 130 135 140
 Ser Thr Glu Lys Ile Thr Ala Ser Asp Gly Val Leu Lys Gly Asp Val
 145 150 155 160
 Thr Met Tyr Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Asn His Lys Cys Gln Phe
 165 170 175
 Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Glu Ile Leu Glu Met Pro Gly Asp
 180 185 190
 His Tyr Ile Gly His Arg Leu Val Arg Lys Thr Glu Gly Asn Ile Thr
 195 200 205
 Glu Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Ser
 210 215
 <210> 26

<211> 657

<212> DNA

<213> *Fungia* sp.

<400> 26

```

atg gtg agt gtg att aaa cca gag atg aag atg agg tac tac atg gac 48
Met Val Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys Met Arg Tyr Tyr Met Asp
      1              5              10              15
ggc tcc gtc aat ggg cat gag ttc aca att gaa ggt gaa ggc aca ggc 96
Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly Glu Gly Thr Gly
              20              25              30
aga cct tac gag gga cat caa gag atg aca cta cgc gtc aca atg gcc 144
Arg Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Met Thr Leu Arg Val Thr Met Ala
              35              40              45
gag ggc ggg cca atg cct ttc gcg ttt gac tta gtg tca cac gtg ttc 192
Glu Gly Gly Pro Met Pro Phe Ala Phe Asp Leu Val Ser His Val Phe
              50              55              60
tgt tac ggc cac aga tac ttt act aaa tat cca gaa gag ata cca gac 240
Cys Tyr Gly His Arg Tyr Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Glu Ile Pro Asp
              65              70              75              80
tat ttc aaa caa gca ttt cct gaa ggc ctg tca tgg gaa agg tcg ttg 288
Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu Ser Trp Glu Arg Ser Leu
              85              90              95
gag ttc gaa gat ggt ggg tcc gct tca gtc agt gcg cat ata agc ctt 336
Glu Phe Glu Asp Gly Gly Ser Ala Ser Val Ser Ala His Ile Ser Leu
              100              105              110
aga gga aac acc ttc tac cac aaa tcc aaa ttt act ggg gtt aac ttt 384
Arg Gly Asn Thr Phe Tyr His Lys Ser Lys Phe Thr Gly Val Asn Phe

```

115 120 125
 cct gcc gat ggt cct atc atg caa aac caa agt gtt gat tgg gag cca 432
 Pro Ala Asp Gly Pro Ile Met Gln Asn Gln Ser Val Asp Trp Glu Pro
 130 135 140
 tca acc gag aaa att act gcc agc gac gga gtt ctg aag ggt gat gtt 480
 Ser Thr Glu Lys Ile Thr Ala Ser Asp Gly Val Leu Lys Gly Asp Val
 145 150 155 160
 acg atg tac cta aaa ctt gaa gga ggc ggc aat cac aaa tgc caa ttc 528
 Thr Met Tyr Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Asn His Lys Cys Gln Phe
 165 170 175
 aag act act tac aag gcg gca aaa gag att ctt gaa atg cca gga gac 576
 Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Glu Ile Leu Glu Met Pro Gly Asp
 180 185 190
 cat tac atc ggc cat cgc ctc gtc agg aaa acc gaa ggc aac att act 624
 His Tyr Ile Gly His Arg Leu Val Arg Lys Thr Glu Gly Asn Ile Thr
 195 200 205
 gag ctg gta gaa gat gca gta gct cat tcc taa 657
 Glu Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Ser
 210 215
 <210> 27
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> *Fungia* sp.
 <400> 27
 Met Val Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys Met Arg Tyr Tyr Met Asp
 1 5 10 15
 Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly Glu Gly Thr Gly

20 25 30
Arg Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Met Thr Leu Arg Val Thr Met Ala
35 40 45
Glu Gly Gly Pro Met Pro Phe Ala Phe Asp Leu Val Ser His Val Phe
50 55 60
Cys Tyr Gly His Arg Gln Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Glu Ile Pro Asp
65 70 75 80
Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu Ser Trp Glu Arg Ser Leu
85 90 95
Glu Phe Glu Asp Gly Gly Ser Ala Ser Val Ser Ala His Ile Ser Leu
100 105 110
Arg Gly Asn Thr Phe Tyr His Lys Ser Lys Phe Thr Gly Val Asn Phe
115 120 125
Pro Ala Asp Gly Pro Ile Met Gln Asn Gln Ser Val Asp Trp Glu Pro
130 135 140
Ser Thr Glu Lys Ile Thr Ala Ser Asp Gly Val Leu Lys Gly Asp Val
145 150 155 160
Thr Met Tyr Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Asn His Lys Cys Gln Phe
165 170 175
Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Glu Ile Leu Glu Met Pro Gly Asp
180 185 190
His Tyr Ile Gly His Arg Leu Val Arg Lys Thr Glu Gly Asn Ile Thr
195 200 205
Glu Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Ser
210 215

<210> 28

<211> 657

<212> DNA

<213> *Fungia* sp.

<400> 28

atg gtg agt gtg att aaa cca gag atg aag atg agg tac tac atg gac 48

Met Val Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys Met Arg Tyr Tyr Met Asp

1

5

10

15

ggc tcc gtc aat ggg cat gag ttc aca att gaa ggt gaa ggc aca ggc 96

Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly Glu Gly Thr Gly

20

25

30

aga cct tac gag gga cat caa gag atg aca cta cgc gtc aca atg gcc 144

Arg Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Met Thr Leu Arg Val Thr Met Ala

35

40

45

gag ggc ggg cca atg cct ttc gcg ttt gac tta gtg tca cac gtg ttc 192

Glu Gly Gly Pro Met Pro Phe Ala Phe Asp Leu Val Ser His Val Phe

50

55

60

tgt tac ggc cac aga cag ttt act aaa tat cca gaa gag ata cca gac 240

Cys Tyr Gly His Arg Gln Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Glu Ile Pro Asp

65

70

75

80

tat ttc aaa caa gca ttt cct gaa ggc ctg tca tgg gaa agg tcg ttg 288

Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu Ser Trp Glu Arg Ser Leu

85

90

95

gag ttc gaa gat ggt ggg tcc gct tca gtc agt gcg cat ata agc ctt 336

Glu Phe Glu Asp Gly Gly Ser Ala Ser Val Ser Ala His Ile Ser Leu

100

105

110

aga gga aac acc ttc tac cac aaa tcc aaa ttt act ggg gtt aac ttt 384

Arg Gly Asn Thr Phe Tyr His Lys Ser Lys Phe Thr Gly Val Asn Phe

115

120

125

cct gcc gat ggt cct atc atg caa aac caa agt gtt gat tgg gag cca 432
 Pro Ala Asp Gly Pro Ile Met Gln Asn Gln Ser Val Asp Trp Glu Pro
 130 135 140
 tca acc gag aaa att act gcc agc gac gga gtt ctg aag ggt gat gtt 480
 Ser Thr Glu Lys Ile Thr Ala Ser Asp Gly Val Leu Lys Gly Asp Val
 145 150 155 160
 acg atg tac cta aaa ctt gaa gga ggc ggc aat cac aaa tgc caa ttc 528
 Thr Met Tyr Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Asn His Lys Cys Gln Phe
 165 170 175
 aag act act tac aag gcg gca aaa gag att ctt gaa atg cca gga gac 576
 Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Glu Ile Leu Glu Met Pro Gly Asp
 180 185 190
 cat tac atc ggc cat cgc ctc gtc agg aaa acc gaa ggc aac att act 624
 His Tyr Ile Gly His Arg Leu Val Arg Lys Thr Glu Gly Asn Ile Thr
 195 200 205
 gag ctg gta gaa gat gca gta gct cat tcc taa 657
 Glu Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Ser
 210 215

<210> 29

<211> 218

<212> PRT

<213> *Fungia* sp.

<220>

<221> UNSURE

<222> (186)

<223> unknown amino acid

<400> 29

Met	Val	Ser	Val	Ile	Lys	Pro	Glu	Met	Lys	Met	Arg	Tyr	Tyr	Met	Asp
1				5					10					15	
Gly	Ser	Val	Asn	Gly	His	Glu	Phe	Thr	Ile	Glu	Gly	Glu	Gly	Thr	Gly
			20					25					30		
Arg	Pro	Tyr	Glu	Gly	His	Gln	Glu	Met	Thr	Leu	Arg	Val	Thr	Met	Ala
		35					40					45			
Glu	Gly	Gly	Pro	Met	Pro	Phe	Ala	Phe	Asp	Leu	Val	Ser	His	Val	Phe
	50					55					60				
Cys	Tyr	Gly	His	Arg	Asn	Phe	Thr	Lys	Tyr	Pro	Glu	Glu	Ile	Pro	Asp
65					70					75					80
Tyr	Phe	Lys	Gln	Ala	Phe	Pro	Glu	Gly	Leu	Ser	Trp	Glu	Arg	Ser	Leu
				85					90					95	
Glu	Phe	Glu	Asp	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Val	Ser	Ala	His	Ile	Ser	Leu
			100					105					110		
Arg	Gly	Asn	Thr	Phe	Tyr	His	Lys	Ser	Lys	Phe	Thr	Gly	Val	Asn	Phe
		115					120					125			
Pro	Ala	Asp	Gly	Pro	Ile	Met	Gln	Asn	Gln	Ser	Val	Asp	Trp	Glu	Pro
	130					135					140				
Ser	Thr	Glu	Lys	Ile	Thr	Ala	Ser	Asp	Gly	Val	Leu	Lys	Gly	Asp	Val
145				150						155				160	
Thr	Met	Tyr	Leu	Lys	Leu	Glu	Gly	Gly	Gly	Asn	His	Lys	Cys	Gln	Phe
				165					170					175	
Lys	Thr	Thr	Tyr	Lys	Ala	Ala	Lys	Glu	Xaa	Leu	Glu	Met	Pro	Gly	Asp
			180					185						190	
His	Tyr	Ile	Gly	His	Arg	Leu	Val	Arg	Lys	Thr	Glu	Gly	Asn	Ile	Thr
		195					200						205		
Glu	Leu	Val	Glu	Asp	Ala	Val	Ala	His	Ser						

210

215

<210> 30

<211> 657

<212> DNA

<213> *Fungia* sp.

<220>

<221> unsure

<222> (556)

<223> unknown nucleotide

<400> 30

atg gtg agt gtg att aaa cca gag atg aag atg agg tac tac atg gac 48

Met Val Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys Met Arg Tyr Tyr Met Asp

1

5

10

15

ggc tcc gtc aat ggg cat gag ttc aca att gaa ggt gaa ggc aca ggc 96

Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly Glu Gly Thr Gly

20

25

30

aga cct tac gag gga cat caa gag atg aca cta cgc gtc aca atg gcc 144

Arg Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Met Thr Leu Arg Val Thr Met Ala

35

40

45

gag ggc ggg cca atg cct ttc gcg ttt gac tta gtg tca cac gtg ttc 192

Glu Gly Gly Pro Met Pro Phe Ala Phe Asp Leu Val Ser His Val Phe

50

55

60

tgt tac ggc cac aga aat ttt act aaa tat cca gaa gag ata cca gac 240

Cys Tyr Gly His Arg Asn Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Glu Ile Pro Asp

65

70

75

80

tat ttc aaa caa gca ttt cct gaa ggc ctg tca tgg gaa agg tcg ttg 288

Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu Ser Trp Glu Arg Ser Leu

	85	90	95	
	gag ttc gaa gat ggt ggg tcc gct tca gtc agt gcg cat ata agc ctt 336			
	Glu Phe Glu Asp Gly Gly Ser Ala Ser Val Ser Ala His Ile Ser Leu			
	100	105	110	
	aga gga aac acc ttc tac cac aaa tcc aaa ttt act ggg gtt aac ttt 384			
	Arg Gly Asn Thr Phe Tyr His Lys Ser Lys Phe Thr Gly Val Asn Phe			
	115	120	125	
	cct gcc gat ggt cct atc atg caa aac caa agt gtt gat tgg gag cca 432			
	Pro Ala Asp Gly Pro Ile Met Gln Asn Gln Ser Val Asp Trp Glu Pro			
	130	135	140	
	tca acc gag aaa att act gcc agc gac gga gtt ctg aag ggt gat gtt 480			
	Ser Thr Glu Lys Ile Thr Ala Ser Asp Gly Val Leu Lys Gly Asp Val			
	145	150	155	160
	acg atg tac cta aaa ctt gaa gga ggc ggc aat cac aaa tgc caa ttc 528			
	Thr Met Tyr Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Asn His Lys Cys Gln Phe			
	165	170	175	
	aag act act tac aag gcg gca aaa gag ntt ctt gaa atg cca gga gac 576			
	Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Glu Xaa Leu Glu Met Pro Gly Asp			
	180	185	190	
	cat tac atc ggc cat cgc ctc gtc agg aaa acc gaa ggc aac att act 624			
	His Tyr Ile Gly His Arg Leu Val Arg Lys Thr Glu Gly Asn Ile Thr			
	195	200	205	
	gag ctg gta gaa gat gca gta gct cat tcc taa 657			
	Glu Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Ser			
	210	215		
	<210> 31			
	<211> 665			

<212> PRT

<213> Fungia sp.

<400> 31

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15
Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30
Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
35 40 45
Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
50 55 60
Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
65 70 75 80
Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
85 90 95
Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
100 105 110
Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
115 120 125
Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
130 135 140
Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
145 150 155 160
Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
165 170 175
Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
180 185 190

Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
 195 200 205
 Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
 210 215 220
 Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
 225 230 235 240
 Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
 245 250 255
 Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
 260 265 270
 Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
 275 280 285
 Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
 290 295 300
 Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
 305 310 315 320
 Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
 325 330 335
 Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
 340 345 350
 Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
 355 360 365
 Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala
 370 375 380
 Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
 385 390 395 400
 Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser

405 410 415
Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
420 425 430
Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu Gly Ser Gly Gly Glu Phe Met
435 440 445
Val Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys Met Arg Tyr Tyr Met Asp Gly
450 455 460
Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly Glu Gly Thr Gly Arg
465 470 475 480
Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Met Thr Leu Arg Val Thr Met Ala Glu
485 490 495
Gly Gly Pro Met Pro Phe Ala Phe Asp Leu Val Ser His Val Phe Cys
500 505 510
Tyr Gly His Arg Val Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Glu Ile Pro Asp Tyr
515 520 525
Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu Ser Trp Glu Arg Ser Leu Glu
530 535 540
Phe Glu Asp Gly Gly Ser Ala Ser Val Ser Ala His Ile Ser Leu Arg
545 550 555 560
Gly Asn Thr Phe Tyr His Lys Ser Lys Phe Thr Gly Val Asn Phe Pro
565 570 575
Ala Asp Gly Pro Ile Met Gln Asn Gln Ser Val Asp Trp Glu Pro Ser
580 585 590
Thr Glu Lys Ile Thr Ala Ser Asp Gly Val Leu Lys Gly Asp Val Thr
595 600 605
Met Tyr Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Asn His Lys Cys Gln Phe Lys
610 615 620

Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Glu Ile Leu Glu Met Pro Gly Asp His

625 630 635 640

Tyr Ile Gly His Arg Leu Val Arg Lys Thr Glu Gly Asn Ile Thr Glu

645 650 655

Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Ser

660 665

<210> 32

<211> 1998

<212> DNA

<213> Fungia sp.

<400> 32

atg gct gag ccc cgc cag gag ttc gaa gtg atg gaa gat cac gct ggg 48

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly

1 5 10 15

acg tac ggg ttg ggg gac agg aaa gat cag ggg ggc tac acc atg cac 96

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His

20 25 30

caa gac caa gag ggt gac acg gac gct ggc ctg aaa gaa tct ccc ctg 144

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu

35 40 45

cag acc ccc act gag gac gga tct gag gaa ccg ggc tct gaa acc tct 192

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser

50 55 60

gat gct aag agc act cca aca gcg gaa gat gtg aca gca ccc tta gtg 240

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val

65 70 75 80

gat gag gga gct ccc ggc aag cag gct gcc gcg cag ccc cac acg gag 288

Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
 85 90 95
 atc cca gaa gga acc aca gct gaa gaa gca ggc att gga gac acc ccc 336
 Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
 100 105 110
 agc ctg gaa gac gaa gct gct ggt cac gtg acc caa gct cgc atg gtc 384
 Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
 115 120 125
 agt aaa agc aaa gac ggg act gga agc gat gac aaa aaa gcc aag ggg 432
 Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
 130 135 140
 gct gat ggt aaa acg aag atc gcc aca ccg cgg gga gca gcc cct cca 480
 Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
 145 150 155 160
 ggc cag aag ggc cag gcc aac gcc acc agg att cca gca aaa acc ccg 528
 Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
 165 170 175
 ccc gct cca aag aca cca ccc agc tct ggt gaa cct cca aaa tca ggg 576
 Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
 180 185 190
 gat cgc agc ggc tac agc agc ccc ggc tcc cca ggc act ccc ggc agc 624
 Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
 195 200 205
 cgc tcc cgc acc ccg tcc ctt cca acc cca ccc acc cgg gag ccc aag 672
 Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
 210 215 220
 aag gtg gca gtg gtc cgt act cca ccc aag tcg ccg tct tcc gcc aag 720

Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
 225 230 235 240
 agc cgc ctg cag aca gcc ccc gtg ccc atg cca gac ctg aag aat gtc 768
 Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
 245 250 255
 aag tcc aag atc ggc tcc act gag aac ctg aag cac cag ccg gga ggc 816
 Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
 260 265 270
 ggg aag gtg cag ata att aat aag aag ctg gat ctt agc aac gtc cag 864
 Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
 275 280 285
 tcc aag tgt ggc tca aag gat aat atc aaa cac gtc ccg gga ggc ggc 912
 Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
 290 295 300
 agt gtg caa ata gtc tac aaa cca gtt gac ctg agc aag gtg acc tcc 960
 Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
 305 310 315 320
 aag tgt ggc tca tta ggc aac atc cat cat aaa cca gga ggt ggc cag 1008
 Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
 325 330 335
 gtg gaa gta aaa tct gag aag ctt gac ttc aag gac aga gtc cag tcg 1056
 Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
 340 345 350
 aag att ggg tcc ctg gac aat atc acc cac gtc cct ggc gga gga aat 1104
 Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
 355 360 365
 aaa aag att gaa acc cac aag ctg acc ttc cgc gag aac gcc aaa gcc 1152

Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala
 370 375 380
 aag aca gac cac ggg gcg gag atc gtg tac aag tcg cca gtg gtg tct 1200
 Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
 385 390 395 400
 ggg gac acg tct cca cgg cat ctc agc aat gtc tcc tcc acc ggc agc 1248
 Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
 405 410 415
 atc gac atg gta gac tcg ccc cag ctc gcc acg cta gct gac gag gtg 1296
 Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
 420 425 430
 tct gcc tcc ctg gcc aag cag ggt ttg gga tcc gga ggt gaa ttc atg 1344
 Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu Gly Ser Gly Gly Glu Phe Met
 435 440 445
 gtg agt gtg att aaa cca gag atg aag atg agg tac tac atg gac ggc 1392
 Val Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys Met Arg Tyr Tyr Met Asp Gly
 450 455 460
 tcc gtc aat ggg cat gag ttc aca att gaa ggt gaa ggc aca ggc aga 1440
 Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly Glu Gly Thr Gly Arg
 465 470 475 480
 cct tac gag gga cat caa gag atg aca cta cgc gtc aca atg gcc gag 1488
 Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Met Thr Leu Arg Val Thr Met Ala Glu
 485 490 495
 ggc ggg cca atg cct ttc gcg ttt gac tta gtg tca cac gtg ttc tgt 1536
 Gly Gly Pro Met Pro Phe Ala Phe Asp Leu Val Ser His Val Phe Cys
 500 505 510
 tac ggc cac aga gta ttt act aaa tat cca gaa gag ata cca gac tat 1584

Tyr Gly His Arg Val Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Glu Ile Pro Asp Tyr
 515 520 525
 ttc aaa caa gca ttt cct gaa ggc ctg tca tgg gaa agg tcg ttg gag 1632
 Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu Ser Trp Glu Arg Ser Leu Glu
 530 535 540
 ttc gaa gat ggt ggg tcc gct tca gtc agt gcg cat ata agc ctt aga 1680
 Phe Glu Asp Gly Gly Ser Ala Ser Val Ser Ala His Ile Ser Leu Arg
 545 550 555 560
 gga aac acc ttc tac cac aaa tcc aaa ttt act ggg gtt aac ttt cct 1728
 Gly Asn Thr Phe Tyr His Lys Ser Lys Phe Thr Gly Val Asn Phe Pro
 565 570 575
 gcc gat ggt cct atc atg caa aac caa agt gtt gat tgg gag cca tca 1776
 Ala Asp Gly Pro Ile Met Gln Asn Gln Ser Val Asp Trp Glu Pro Ser
 580 585 590
 acc gag aaa att act gcc agc gac gga gtt ctg aag ggt gat gtt acg 1824
 Thr Glu Lys Ile Thr Ala Ser Asp Gly Val Leu Lys Gly Asp Val Thr
 595 600 605
 atg tac cta aaa ctt gaa gga ggc ggc aat cac aaa tgc caa ttc aag 1872
 Met Tyr Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Asn His Lys Cys Gln Phe Lys
 610 615 620
 act act tac aag gcg gca aaa gag att ctt gaa atg cca gga gac cat 1920
 Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Glu Ile Leu Glu Met Pro Gly Asp His
 625 630 635 640
 tac atc ggc cat cgc ctc gtc agg aaa acc gaa ggc aac att act gag 1968
 Tyr Ile Gly His Arg Leu Val Arg Lys Thr Glu Gly Asn Ile Thr Glu
 645 650 655
 ctg gta gaa gat gca gta gct cat tcc taa 1998

Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Ser

660

665

<210> 33

<211> 480

<212> PRT

<213> Fungia sp.

<400> 33

Met Gly Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys

1

5

10

15

Met Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Val His Gly Gln Gly Asn

20

25

30

Leu Ala Tyr Pro Ala Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn

35

40

45

Gly Pro Arg Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Thr Thr Ser Leu Ala Asp

50

55

60

Thr Phe Glu His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val

65

70

75

80

Arg Pro Asn Glu Glu Asn His Lys Asp Ala Asp Leu Tyr Thr Ser Arg

85

90

95

Val Met Leu Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu

100

105

110

Leu Glu Glu Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg

115

120

125

Val Arg Arg His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys

130

135

140

Asp Ser Ile Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val

145

150

155

160

Asp Met Ser Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser			
	165	170	175
Lys Gly Gln Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met			
	180	185	190
Gly Tyr Thr Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn			
	195	200	205
Ser Gln Cys Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp			
	210	215	220
Ser Lys Lys Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys			
225	230	235	240
Val Cys Thr Leu Thr Ile Lys Arg Gly Arg Gly Val Pro Arg Ala Arg			
	245	250	255
Asp Pro Pro Val Ala Thr Met Val Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys			
	260	265	270
Met Arg Tyr Tyr Met Asp Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile			
	275	280	285
Glu Gly Glu Gly Thr Gly Arg Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Met Thr			
	290	295	300
Leu Arg Val Thr Met Ala Glu Gly Gly Pro Met Pro Phe Ala Phe Asp			
305	310	315	320
Leu Val Ser His Val Phe Cys Tyr Gly His Arg Val Phe Thr Lys Tyr			
	325	330	335
Pro Glu Glu Ile Pro Asp Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu			
	340	345	350
Ser Trp Glu Arg Ser Leu Glu Phe Glu Asp Gly Gly Ser Ala Ser Val			
	355	360	365
Ser Ala His Ile Ser Leu Arg Gly Asn Thr Phe Tyr His Lys Ser Lys			

370 375 380
 Phe Thr Gly Val Asn Phe Pro Ala Asp Gly Pro Ile Met Gln Asn Gln
 385 390 395 400
 Ser Val Asp Trp Glu Pro Ser Thr Glu Lys Ile Thr Ala Ser Asp Gly
 405 410 415
 Val Leu Lys Gly Asp Val Thr Met Tyr Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly
 420 425 430
 Asn His Lys Cys Gln Phe Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Glu Ile
 435 440 445
 Leu Glu Met Pro Gly Asp His Tyr Ile Gly His Arg Leu Val Arg Lys
 450 455 460
 Thr Glu Gly Asn Ile Thr Glu Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Ser
 465 470 475 480

<210> 34

<211> 1443

<212> DNA

<213> *Fungia* sp.

<400> 34

atg gga acc atc ctt ttc ctt act atg gtt att tca tac ttc ggt tgc 48
 Met Gly Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys
 1 5 10 15
 atg aag gct gcg ccc atg aaa gaa gca aac gtc cac gga caa ggc aac 96
 Met Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Val His Gly Gln Gly Asn
 20 25 30
 ttg gcc tac cca gct gtg cgg acc cat ggg act ctg gag agc gtg aat 144
 Leu Ala Tyr Pro Ala Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn
 35 40 45

ggg ccc agg gca ggt tcg aga ggt ctg acg acg acg tcc ctg gct gac 192
 Gly Pro Arg Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Thr Thr Ser Leu Ala Asp
 50 55 60
 act ttt gag cac gtg atc gaa gag ctg ctg gat gag gac cag aag gtt 240
 Thr Phe Glu His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val
 65 70 75 80
 cgg ccc aac gaa gaa aac cat aag gac gcg gac ttg tac act tcc cgg 288
 Arg Pro Asn Glu Glu Asn His Lys Asp Ala Asp Leu Tyr Thr Ser Arg
 85 90 95
 gtg atg ctc agc agt caa gtg cct ttg gag cct cct ctg ctc ttt ctg 336
 Val Met Leu Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu
 100 105 110
 ctg gag gaa tac aaa aat tac ctg gat gcc gca aac atg tct atg agg 384
 Leu Glu Glu Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg
 115 120 125
 gtt cgg cgc cac tcc gac ccc gcc cgc cgt ggg gag ctg agc gtg tgt 432
 Val Arg Arg His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys
 130 135 140
 gac agt att agc gag tgg gtc aca gcg gca gat aaa aag act gca gtg 480
 Asp Ser Ile Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val
 145 150 155 160
 gac atg tcc ggt ggg acg gtc aca gtc ctg gag aaa gtc ccg gta tca 528
 Asp Met Ser Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser
 165 170 175
 aaa ggc caa ctg aag caa tat ttc tac gag acc aag tgt aat ccc atg 576
 Lys Gly Gln Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met
 180 185 190

ggt tac acg aag gaa ggc tgc agg ggc ata gac aaa agg cac tgg aac 624
Gly Tyr Thr Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn
195 200 205
tcg caa tgc cga act acc caa tcg tat gtt cgg gcc ctt act atg gat 672
Ser Gln Cys Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp
210 215 220
agc aaa aag aga att ggc tgg cgg ttc ata agg ata gac act tcc tgt 720
Ser Lys Lys Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys
225 230 235 240
gta tgt aca ctg acc att aaa agg gga aga ggg gta ccg cgg gcc cgg 768
Val Cys Thr Leu Thr Ile Lys Arg Gly Arg Gly Val Pro Arg Ala Arg
245 250 255
gac cca ccg gtc gcc acc atg gtg agt gtg att aaa cca gag atg aag 816
Asp Pro Pro Val Ala Thr Met Val Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys
260 265 270
atg agg tac tac atg gac ggc tcc gtc aat ggg cat gag ttc aca att 864
Met Arg Tyr Tyr Met Asp Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile
275 280 285
gaa ggt gaa ggc aca ggc aga cct tac gag gga cat caa gag atg aca 912
Glu Gly Glu Gly Thr Gly Arg Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Met Thr
290 295 300
cta cgc gtc aca atg gcc gag ggc ggg cca atg cct ttc gcg ttt gac 960
Leu Arg Val Thr Met Ala Glu Gly Gly Pro Met Pro Phe Ala Phe Asp
305 310 315 320
tta gtg tca cac gtg ttc tgt tac ggc cac aga gta ttt act aaa tat 1008
Leu Val Ser His Val Phe Cys Tyr Gly His Arg Val Phe Thr Lys Tyr
325 330 335

cca gaa gag ata cca gac tat ttc aaa caa gca ttt cct gaa ggc ctg 1056
Pro Glu Glu Ile Pro Asp Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu
340 345 350
tca tgg gaa agg tcg ttg gag ttc gaa gat ggt ggg tcc gct tca gtc 1104
Ser Trp Glu Arg Ser Leu Glu Phe Glu Asp Gly Gly Ser Ala Ser Val
355 360 365
agt gcg cat ata agc ctt aga gga aac acc ttc tac cac aaa tcc aaa 1152
Ser Ala His Ile Ser Leu Arg Gly Asn Thr Phe Tyr His Lys Ser Lys
370 375 380
ttt act ggg gtt aac ttt cct gcc gat ggt cct atc atg caa aac caa 1200
Phe Thr Gly Val Asn Phe Pro Ala Asp Gly Pro Ile Met Gln Asn Gln
385 390 395 400
agt gtt gat tgg gag cca tca acc gag aaa att act gcc agc gac gga 1248
Ser Val Asp Trp Glu Pro Ser Thr Glu Lys Ile Thr Ala Ser Asp Gly
405 410 415
gtt ctg aag ggt gat gtt acg atg tac cta aaa ctt gaa gga ggc ggc 1296
Val Leu Lys Gly Asp Val Thr Met Tyr Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly
420 425 430
aat cac aaa tgc caa ttc aag act act tac aag gcg gca aaa gag att 1344
Asn His Lys Cys Gln Phe Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Glu Ile
435 440 445
ctt gaa atg cca gga gac cat tac atc ggc cat cgc ctc gtc agg aaa 1392
Leu Glu Met Pro Gly Asp His Tyr Ile Gly His Arg Leu Val Arg Lys
450 455 460
acc gaa ggc aac att act gag ctg gta gaa gat gca gta gct cat tcc 1440
Thr Glu Gly Asn Ile Thr Glu Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Ser
465 470 475 480

taa

1443

<210> 35

<211> 464

<212> PRT

<213> *Fungia* sp.

<400> 35

Met Val Ser Tyr Ser Lys Gln Gly Ile Ala Gln Glu Met Arg Thr Lys

1

5

10

15

Tyr Arg Met Glu Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly

20

25

30

Val Gly Thr Gly Asn Pro Tyr Glu Gly Lys Gln Met Ser Glu Leu Val

35

40

45

Ile Ile Lys Ser Lys Gly Lys Pro Leu Pro Phe Ser Phe Asp Ile Leu

50

55

60

Ser Thr Ala Phe Gln Tyr Gly Asn Arg Cys Phe Thr Lys Tyr Pro Ala

65

70

75

80

Asp Met Pro Asp Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Asp Gly Met Ser Tyr

85

90

95

Glu Arg Ser Phe Leu Phe Glu Asp Gly Gly Val Ala Thr Ala Ser Trp

100

105

110

Ser Ile Arg Leu Glu Gly Asn Cys Phe Ile His Asn Ser Ile Tyr His

115

120

125

Gly Val Asn Phe Pro Ala Asp Gly Pro Val Met Lys Lys Gln Thr Ile

130

135

140

Gly Trp Asp Lys Ser Phe Glu Lys Met Ser Val Ala Lys Glu Val Leu

145

150

155

160

Arg Gly Asp Val Thr Gln Phe Leu Leu Leu Glu Gly Gly Gly Tyr Gln

165	170	175
Arg Cys Arg Phe His Ser Thr Tyr Lys Thr Glu Lys Pro Val Ala Met		
180	185	190
Pro Pro Ser His Val Val Glu His Gln Ile Val Arg Thr Asp Leu Gly		
195	200	205
Gln Thr Ala Lys Gly Phe Lys Val Lys Leu Glu Glu His Ala Glu Ala		
210	215	220
His Val Asn Pro Leu Lys Val Lys Gly Gly Ser Gly Gly Asp Glu Val		
225	230	235
Asp Gly Thr Gly Gly Ser Met Val Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys		
245	250	255
Met Arg Tyr Tyr Met Asp Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile		
260	265	270
Glu Gly Glu Gly Thr Gly Arg Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Met Thr		
275	280	285
Leu Arg Val Thr Met Ala Lys Gly Gly Pro Met Pro Phe Ala Phe Asp		
290	295	300
Leu Val Ser His Val Phe Cys Tyr Gly His Arg Pro Phe Thr Lys Tyr		
305	310	315
Pro Glu Glu Ile Pro Asp Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu		
325	330	335
Ser Trp Glu Arg Ser Leu Glu Phe Glu Asp Gly Gly Ser Ala Ser Val		
340	345	350
Ser Ala His Ile Ser Leu Arg Gly Asn Thr Phe Tyr His Lys Ser Lys		
355	360	365
Phe Thr Gly Val Asn Phe Pro Ala Asp Gly Pro Ile Met Gln Asn Gln		
370	375	380

Ser Val Asp Trp Glu Pro Ser Thr Glu Lys Ile Thr Ala Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Val Leu Lys Gly Asp Val Thr Met Tyr Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly
 405 410 415
 Asn His Lys Cys Gln Phe Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Lys Ile
 420 425 430
 Leu Lys Met Pro Gly Ser His Tyr Ile Ser His Arg Leu Val Arg Lys
 435 440 445
 Thr Glu Gly Asn Ile Thr Glu Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Ser
 450 455 460

<210> 36

<211> 1395

<212> DNA

<213> Fungia sp.

<400> 36

atg gtg tct tat tca aag caa ggc atc gca caa gaa atg cgg acg aaa 48
 Met Val Ser Tyr Ser Lys Gln Gly Ile Ala Gln Glu Met Arg Thr Lys
 1 5 10 15
 tac cgt atg gaa ggc agt gtc aat ggc cat gaa ttc acg atc gaa ggt 96
 Tyr Arg Met Glu Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly
 20 25 30
 gta gga act gga aac cct tac gaa ggg aaa cag atg tcc gaa tta gtg 144
 Val Gly Thr Gly Asn Pro Tyr Glu Gly Lys Gln Met Ser Glu Leu Val
 35 40 45
 atc atc aag tct aag gga aaa ccc ctt cca ttc tcc ttt gac ata ctg 192
 Ile Ile Lys Ser Lys Gly Lys Pro Leu Pro Phe Ser Phe Asp Ile Leu
 50 55 60

tca aca gcc ttt caa tat gga aac aga tgc ttc aca aag tac cct gca 240
Ser Thr Ala Phe Gln Tyr Gly Asn Arg Cys Phe Thr Lys Tyr Pro Ala
65 70 75 80
gac atg cct gac tat ttc aag caa gca ttc cca gat gga atg tca tat 288
Asp Met Pro Asp Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Asp Gly Met Ser Tyr
85 90 95
gaa agg tca ttt cta ttt gag gat gga gga gtt gct aca gcc agc tgg 336
Glu Arg Ser Phe Leu Phe Glu Asp Gly Gly Val Ala Thr Ala Ser Trp
100 105 110
agc att cgt ctc gaa gga aat tgc ttc atc cac aat tcc atc tat cat 384
Ser Ile Arg Leu Glu Gly Asn Cys Phe Ile His Asn Ser Ile Tyr His
115 120 125
ggc gta aac ttt ccc gct gat gga ccc gta atg aag aag cag aca att 432
Gly Val Asn Phe Pro Ala Asp Gly Pro Val Met Lys Lys Gln Thr Ile
130 135 140
ggc tgg gat aag tcc ttc gaa aaa atg agt gtg gct aaa gag gtg cta 480
Gly Trp Asp Lys Ser Phe Glu Lys Met Ser Val Ala Lys Glu Val Leu
145 150 155 160
aga ggt gat gtg act cag ttt ctt ctg ctc gaa gga ggt ggt tac cag 528
Arg Gly Asp Val Thr Gln Phe Leu Leu Leu Glu Gly Gly Gly Tyr Gln
165 170 175
aga tgc cgg ttt cac tcc act tac aaa acg gag aag cca gtc gca atg 576
Arg Cys Arg Phe His Ser Thr Tyr Lys Thr Glu Lys Pro Val Ala Met
180 185 190
ccc ccg agt cat gtc gta gaa cat caa att gtg agg acc gac ctt ggc 624
Pro Pro Ser His Val Val Glu His Gln Ile Val Arg Thr Asp Leu Gly
195 200 205

caa act gca aaa ggc ttc aag gtc aag ctg gaa gaa cat gct gag gct 672
Gln Thr Ala Lys Gly Phe Lys Val Lys Leu Glu Glu His Ala Glu Ala
210 215 220
cat gtt aac cct ttg aag gtt aaa ggt ggc agc ggt ggc gac gag gtg 720
His Val Asn Pro Leu Lys Val Lys Gly Gly Ser Gly Gly Asp Glu Val
225 230 235 240
gac ggt acc ggt ggc agc atg gtg agt gtg att aaa cca gag atg aag 768
Asp Gly Thr Gly Gly Ser Met Val Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys
245 250 255
atg agg tac tac atg gac ggc tcc gtc aat ggg cat gag ttc aca att 816
Met Arg Tyr Tyr Met Asp Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile
260 265 270
gaa ggt gaa ggc aca ggc aga cct tac gag gga cat caa gag atg aca 864
Glu Gly Glu Gly Thr Gly Arg Pro Tyr Glu Gly His Gln Glu Met Thr
275 280 285
cta cgc gtc aca atg gcc aag ggc ggg cca atg cct ttc gcg ttt gac 912
Leu Arg Val Thr Met Ala Lys Gly Gly Pro Met Pro Phe Ala Phe Asp
290 295 300
tta gtg tca cac gtg ttc tgt tac ggc cac aga cct ttt act aaa tat 960
Leu Val Ser His Val Phe Cys Tyr Gly His Arg Pro Phe Thr Lys Tyr
305 310 315 320
cca gaa gag ata cca gac tat ttc aaa caa gca ttt cct gaa ggc ctg 1008
Pro Glu Glu Ile Pro Asp Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Glu Gly Leu
325 330 335
tca tgg gaa agg tcg ttg gag ttc gaa gat ggt ggg tcc gct tca gtc 1056
Ser Trp Glu Arg Ser Leu Glu Phe Glu Asp Gly Gly Ser Ala Ser Val
340 345 350

agt gcg cat ata agc ctt aga gga aac acc ttc tac cac aaa tcc aaa 1104

Ser Ala His Ile Ser Leu Arg Gly Asn Thr Phe Tyr His Lys Ser Lys

355

360

365

ttt act ggg gtt aac ttt cct gcc gat ggt cct atc atg caa aac caa 1152

Phe Thr Gly Val Asn Phe Pro Ala Asp Gly Pro Ile Met Gln Asn Gln

370

375

380

agt gtt gat tgg gag cca tca acc gag aaa att act gcc agc gac gga 1200

Ser Val Asp Trp Glu Pro Ser Thr Glu Lys Ile Thr Ala Ser Asp Gly

385

390

395

400

gtt ctg aag ggt gat gtt acg atg tac cta aaa ctt gaa gga ggc ggc 1248

Val Leu Lys Gly Asp Val Thr Met Tyr Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly

405

410

415

aat cac aaa tgc caa ttc aag act act tac aag gcg gca aaa aag att 1296

Asn His Lys Cys Gln Phe Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Ala Lys Lys Ile

420

425

430

ctt aaa atg cca gga agc cat tac atc agc cat cgc ctc gtc agg aaa 1344

Leu Lys Met Pro Gly Ser His Tyr Ile Ser His Arg Leu Val Arg Lys

435

440

445

acc gaa ggc aac att act gag ctg gta gaa gat gca gta gct cat tcc 1392

Thr Glu Gly Asn Ile Thr Glu Leu Val Glu Asp Ala Val Ala His Ser

450

455

460

taa

1395

<210> 37

<211> 221

<212> PRT

<213> *Montipora. sp*

<400> 37

Met Ser Val Ile Ala Lys Gln Met Thr Tyr Lys Val Tyr Met Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Val Asn Gly His Tyr Phe Glu Val Glu Gly Asp Gly Lys Gly Lys
 20 25 30
 Pro Tyr Glu Gly Glu Gln Thr Val Lys Leu Thr Val Thr Lys Gly Gly
 35 40 45
 Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Leu Ser Gln Tyr Gly
 50 55 60
 Ser Ile Pro Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Asp Ile Pro Asp Tyr Val Lys
 65 70 75 80
 Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Thr Trp Glu Arg Ile Met His Phe Glu
 85 90 95
 Asp Gly Ala Val Cys Thr Val Ser Asn Asp Ser Ser Ile Gln Gly Asn
 100 105 110
 Cys Phe Ile Tyr Asn Val Lys Ile Ser Gly Val Asn Phe Pro Pro Asn
 115 120 125
 Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Gln Gly Trp Glu Pro Asn Thr Glu
 130 135 140
 Arg Leu Phe Ala Arg Asp Gly Met Leu Ile Gly Asn Asn Phe Met Ala
 145 150 155 160
 Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly His Tyr Leu Cys Glu Phe Lys Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val Arg Met Pro Gly Tyr His Tyr Val Asp
 180 185 190
 Arg Lys Leu Asp Val Thr Ser His Asn Lys Asp Tyr Thr Phe Val Glu
 195 200 205
 Gln Cys Glu Ile Ser Ile Ala Arg His Ser Leu Leu Gly

210 215 220
 <210> 38
 <211> 666
 <212> DNA
 <213> *Montipora. sp*
 <400> 38
 atg agt gtg atc gct aaa caa atg acc tac aag gtt tat atg tca ggc 48
 Met Ser Val Ile Ala Lys Gln Met Thr Tyr Lys Val Tyr Met Ser Gly
 1 5 10 15
 acg gtc aat gga cac tac ttt gag gtc gaa ggc gat gga aaa gga aag 96
 Thr Val Asn Gly His Tyr Phe Glu Val Glu Gly Asp Gly Lys Gly Lys
 20 25 30
 cct tac gag ggg gag cag acg gta aag ctc act gtc acc aag ggt gga 144
 Pro Tyr Glu Gly Glu Gln Thr Val Lys Leu Thr Val Thr Lys Gly Gly
 35 40 45
 cct ctg cca ttt gct tgg gat att tta tca cca ctg tct cag tac gga 192
 Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Leu Ser Gln Tyr Gly
 50 55 60
 agc ata cca ttc acc aag tac cct gaa gac atc cct gat tat gta aag 240
 Ser Ile Pro Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Asp Ile Pro Asp Tyr Val Lys
 65 70 75 80
 cag tca ttc cct gag gga tat aca tgg gag agg atc atg cac ttt gaa 288
 Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Thr Trp Glu Arg Ile Met His Phe Glu
 85 90 95
 gat ggt gca gtg tgt act gtc agc aat gat tcc agc atc caa ggc aac 336
 Asp Gly Ala Val Cys Thr Val Ser Asn Asp Ser Ser Ile Gln Gly Asn
 100 105 110

tgt ttc atc tac aat gtc aaa atc tct ggt gtg aac ttt cct ccc aat 384

Cys Phe Ile Tyr Asn Val Lys Ile Ser Gly Val Asn Phe Pro Pro Asn

115

120

125

gga cct gtt atg cag aag aag aca cag ggc tgg gaa ccc aac act gag 432

Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Gln Gly Trp Glu Pro Asn Thr Glu

130

135

140

cgt ctc ttt gca cga gat gga atg ctg ata gga aac aac ttt atg gct 480

Arg Leu Phe Ala Arg Asp Gly Met Leu Ile Gly Asn Asn Phe Met Ala

145

150

155

160

ctg aag ttg gaa gga ggt ggt cac tat ttg tgt gaa ttc aaa tct act 528

Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly His Tyr Leu Cys Glu Phe Lys Ser Thr

165

170

175

tac aag gca aag aag cct gtg agg atg cca ggg tat cac tat gtt gac 576

Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val Arg Met Pro Gly Tyr His Tyr Val Asp

180

185

190

cgc aaa ctg gat gta acc agt cac aac aag gat tac aca ttt gtt gag 624

Arg Lys Leu Asp Val Thr Ser His Asn Lys Asp Tyr Thr Phe Val Glu

195

200

205

cag tgt gaa ata tcc att gca cgc cac tct ttg ctc ggt tga 666

Gln Cys Glu Ile Ser Ile Ala Arg His Ser Leu Leu Gly

210

215

220

<210> 39

<211> 222

<212> PRT

<213> *Montipora. sp*

<400> 39

Met Val Ser Val Ile Ala Lys Gln Met Thr Tyr Lys Val Tyr Met Ser

1	5	10	15
Gly Thr Val Asn Gly His Tyr Phe Glu Val Glu Gly Asp Gly Lys Gly			
20	25	30	
Lys Pro Tyr Glu Gly Glu Gln Thr Val Lys Leu Thr Val Thr Lys Gly			
35	40	45	
Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Leu Ser Gln Tyr			
50	55	60	
Gly Ser Ile Pro Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Asp Ile Pro Asp Tyr Val			
65	70	75	80
Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Thr Trp Glu Arg Ile Met Asn Phe			
85	90	95	
Glu Asp Gly Ala Val Cys Thr Val Ser Asn Asp Ser Ser Ile Gln Gly			
100	105	110	
Asn Cys Phe Ile Tyr Asn Val Lys Ile Ser Gly Val Asn Phe Pro Pro			
115	120	125	
Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Gln Gly Trp Glu Pro Ser Thr			
130	135	140	
Glu Arg Leu Phe Ala Arg Asp Gly Met Leu Ile Gly Asn Asp Phe Met			
145	150	155	160
Ala Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly His Tyr Leu Cys Glu Phe Lys Ser			
165	170	175	
Thr Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val Arg Met Pro Gly Tyr His Tyr Val			
180	185	190	
Asp Arg Lys Leu Asp Val Thr Ser His Asn Arg Asp Tyr Thr Ser Val			
195	200	205	
Glu Gln Cys Glu Ile Ser Ile Ala Arg His Ser Leu Leu Gly			
210	215	220	

<210> 40

<211> 669

<212> DNA

<213> *Montipora. sp*

<400> 40

atg gtg agt gtg atc gct aaa caa atg acc tac aag gtt tat atg tca 48

Met Val Ser Val Ile Ala Lys Gln Met Thr Tyr Lys Val Tyr Met Ser

1

5

10

15

ggc acg gtc aat gga cac tac ttt gag gtc gaa ggc gat gga aaa gga 96

Gly Thr Val Asn Gly His Tyr Phe Glu Val Glu Gly Asp Gly Lys Gly

20

25

30

aag cct tac gag gga gag cag aca gta aag ctc act gtc acc aag ggt 144

Lys Pro Tyr Glu Gly Glu Gln Thr Val Lys Leu Thr Val Thr Lys Gly

35

40

45

gga cct ctg cca ttt gct tgg gat att tta tca cca ctg tct cag tac 192

Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Leu Ser Gln Tyr

50

55

60

gga agc ata cca ttc acc aag tac cct gaa gac atc cct gat tat gta 240

Gly Ser Ile Pro Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Asp Ile Pro Asp Tyr Val

65

70

75

80

aag cag tca ttc cct gag gga tat aca tgg gag agg atc atg aac ttt 288

Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Thr Trp Glu Arg Ile Met Asn Phe

85

90

95

gaa gat ggt gca gtg tgt act gtc agc aat gat tcc agc atc caa ggc 336

Glu Asp Gly Ala Val Cys Thr Val Ser Asn Asp Ser Ser Ile Gln Gly

100

105

110

aac tgt ttc atc tac aat gtc aaa atc tct ggt gtg aac ttt cct ccc 384

Asn Cys Phe Ile Tyr Asn Val Lys Ile Ser Gly Val Asn Phe Pro Pro
 115 120 125
 aat gga cct gtt atg cag aag aag aca cag ggc tgg gaa ccc agc act 432
 Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Gln Gly Trp Glu Pro Ser Thr
 130 135 140
 gag cgt ctc ttt gca cga gat gga atg ctg ata gga aac gat ttt atg 480
 Glu Arg Leu Phe Ala Arg Asp Gly Met Leu Ile Gly Asn Asp Phe Met
 145 150 155 160
 gct ctg aag ttg gaa gga ggt ggt cac tat ttg tgt gaa ttc aaa tct 528
 Ala Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly His Tyr Leu Cys Glu Phe Lys Ser
 165 170 175
 act tac aag gca aag aag cct gtg agg atg cca ggg tat cac tat gtt 576
 Thr Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val Arg Met Pro Gly Tyr His Tyr Val
 180 185 190
 gac cgc aaa ctg gat gta acc agt cac aac agg gat tac aca tct gtt 624
 Asp Arg Lys Leu Asp Val Thr Ser His Asn Arg Asp Tyr Thr Ser Val
 195 200 205
 gag cag tgt gaa ata tcc att gca cgc cac tct ttg ctc ggt tga 669
 Glu Gln Cys Glu Ile Ser Ile Ala Arg His Ser Leu Leu Gly
 210 215 220
 <210> 41
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> *Montipora. sp*
 <400> 41
 Met Val Ser Val Ile Ala Lys Gln Met Thr Tyr Lys Val Tyr Met Ser
 1 5 10 15

Gly Thr Val Asn Gly His Tyr Phe Glu Val Glu Gly Asp Gly Lys Gly
 20 25 30
 Lys Pro Tyr Glu Gly Glu Gln Thr Val Lys Leu Thr Val Thr Lys Gly
 35 40 45
 Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Leu Phe Gln Tyr
 50 55 60
 Gly Ser Ile Pro Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Asp Ile Pro Asp Tyr Val
 65 70 75 80
 Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Thr Trp Glu Arg Thr Met Asn Phe
 85 90 95
 Glu Asp Gly Ala Val Cys Thr Val Ser Asn Asp Ser Ser Ile Gln Gly
 100 105 110
 Asn Cys Phe Ile Tyr Asn Val Lys Ile Ser Gly Thr Asn Phe Pro Pro
 115 120 125
 Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Gln Gly Trp Glu Pro Ser Thr
 130 135 140
 Glu Arg Leu Phe Ala Arg Asp Gly Met Leu Ile Gly Asn Asp Tyr Met
 145 150 155 160
 Ala Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly His Tyr Leu Cys Glu Phe Lys Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val Arg Met Pro Gly Tyr His Tyr Ile
 180 185 190
 Asp Arg Lys Leu Asp Val Thr Ser His Asn Arg Asp Tyr Thr Ser Val
 195 200 205
 Glu Gln Cys Glu Ile Ala Ile Ala Arg His Ser Leu Leu Gly
 210 215 220
 <210> 42

<211> 669

<212> DNA

<213> *Montipora. sp*

<400> 42

atg gtg agt gtg atc gct aaa caa atg acc tac aag gtt tat atg tca 48

Met Val Ser Val Ile Ala Lys Gln Met Thr Tyr Lys Val Tyr Met Ser

1

5

10

15

ggc acg gtc aat gga cac tac ttt gag gtc gaa ggc gat gga aaa gga 96

Gly Thr Val Asn Gly His Tyr Phe Glu Val Glu Gly Asp Gly Lys Gly

20

25

30

aag cct tac gag gga gag cag aca gta aag ctc act gtc acc aag ggt 144

Lys Pro Tyr Glu Gly Glu Gln Thr Val Lys Leu Thr Val Thr Lys Gly

35

40

45

gga cct ctg cca ttt gct tgg gat att tta tca cca ctg ttt cag tac 192

Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Leu Phe Gln Tyr

50

55

60

gga agc ata cca ttc acc aag tac cct gaa gac atc cct gat tat gta 240

Gly Ser Ile Pro Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Asp Ile Pro Asp Tyr Val

65

70

75

80

aag cag tca ttc cct gag gga tat aca tgg gag agg acc atg aac ttt 288

Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Thr Trp Glu Arg Thr Met Asn Phe

85

90

95

gaa gat ggt gca gtg tgt act gtc agc aat gat tcc agc atc caa ggc 336

Glu Asp Gly Ala Val Cys Thr Val Ser Asn Asp Ser Ser Ile Gln Gly

100

105

110

aac tgt ttc atc tac aat gtc aaa atc tct ggt acg aac ttt cct ccc 384

Asn Cys Phe Ile Tyr Asn Val Lys Ile Ser Gly Thr Asn Phe Pro Pro

115 120 125
 aat gga cct gtt atg cag aag aag aca cag ggc tgg gaa ccc agc act 432
 Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Gln Gly Trp Glu Pro Ser Thr
 130 135 140
 gag cgt ctc ttt gca cga gat gga atg ctg ata gga aac gat tat atg 480
 Glu Arg Leu Phe Ala Arg Asp Gly Met Leu Ile Gly Asn Asp Tyr Met
 145 150 155 160
 gct ctg aag ttg gaa gga ggt ggt cac tat ttg tgt gaa ttt aaa tct 528
 Ala Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly His Tyr Leu Cys Glu Phe Lys Ser
 165 170 175
 act tac aag gca aag aag cct gtg agg atg cca ggg tat cac tat att 576
 Thr Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val Arg Met Pro Gly Tyr His Tyr Ile
 180 185 190
 gac cgc aaa ctg gat gta acc agt cac aac agg gat tac aca tct gtt 624
 Asp Arg Lys Leu Asp Val Thr Ser His Asn Arg Asp Tyr Thr Ser Val
 195 200 205
 gag cag tgt gaa ata gcc att gca cgc cac tct ttg ctc ggt tga 669
 Glu Gln Cys Glu Ile Ala Ile Ala Arg His Ser Leu Leu Gly
 210 215 220
 <210> 43
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> *Montipora. sp*
 <400> 43
 Met Val Ser Val Ile Ala Lys Gln Met Thr Tyr Lys Val Tyr Met Ser
 1 5 10 15
 Gly Thr Val Asn Gly His Tyr Phe Glu Val Glu Gly Asp Gly Lys Gly

20 25 30
Lys Pro Tyr Glu Gly Glu Gln Thr Val Lys Leu Thr Val Thr Lys Gly
35 40 45
Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Leu Met Cys Tyr
50 55 60
Gly Ser Ile Pro Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Asp Ile Pro Asp Tyr Val
65 70 75 80
Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Thr Trp Glu Arg Thr Met Asn Phe
85 90 95
Glu Asp Gly Ala Val Cys Thr Val Ser Asn Asp Ser Ser Ile Gln Gly
100 105 110
Asn Cys Phe Ile Tyr Asn Val Lys Ile Ser Gly Thr Asn Phe Pro Pro
115 120 125
Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Gln Gly Trp Glu Pro Ser Thr
130 135 140
Glu Arg Leu Phe Ala Arg Asp Gly Met Leu Ile Gly Asn Asp Tyr Met
145 150 155 160
Ala Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly His Tyr Leu Cys Glu Phe Lys Ser
165 170 175
Thr Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val Arg Met Pro Gly Tyr His Tyr Ile
180 185 190
Asp Arg Lys Leu Asp Val Thr Ser His Asn Arg Asp Tyr Thr Ser Val
195 200 205
Glu Gln Cys Glu Ile Ala Ile Ala Arg His Ser Leu Leu Gly
210 215 220

<210> 44

<211> 669

<212> DNA

<213> *Montipora. sp*

<400> 44

atg gtg agt gtg atc gct aaa caa atg acc tac aag gtt tat atg tca 48

Met Val Ser Val Ile Ala Lys Gln Met Thr Tyr Lys Val Tyr Met Ser

1

5

10

15

ggc acg gtc aat gga cac tac ttt gag gtc gaa ggc gat gga aaa gga 96

Gly Thr Val Asn Gly His Tyr Phe Glu Val Glu Gly Asp Gly Lys Gly

20

25

30

aag cct tac gag gga gag cag aca gta aag ctc act gtc acc aag ggt 144

Lys Pro Tyr Glu Gly Glu Gln Thr Val Lys Leu Thr Val Thr Lys Gly

35

40

45

gga cct ctg cca ttt gct tgg gat att tta tca cca ctg atg tgt tac 192

Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Leu Met Cys Tyr

50

55

60

gga agc ata cca ttc acc aag tac cct gaa gac atc cct gat tat gta 240

Gly Ser Ile Pro Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Asp Ile Pro Asp Tyr Val

65

70

75

80

aag cag tca ttc cct gag gga tat aca tgg gag agg acc atg aac ttt 288

Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Thr Trp Glu Arg Thr Met Asn Phe

85

90

95

gaa gat ggt gca gtg tgt act gtc agc aat gat tcc agc atc caa ggc 336

Glu Asp Gly Ala Val Cys Thr Val Ser Asn Asp Ser Ser Ile Gln Gly

100

105

110

aac tgt ttc atc tac aat gtc aaa atc tct ggt acg aac ttt cct ccc 384

Asn Cys Phe Ile Tyr Asn Val Lys Ile Ser Gly Thr Asn Phe Pro Pro

115

120

125

aat gga cct gtt atg cag aag aag aca cag ggc tgg gaa ccc agc act 432

Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Gln Gly Trp Glu Pro Ser Thr

130

135

140

gag cgt ctc ttt gca cga gat gga atg ctg ata gga aac gat tat atg 480

Glu Arg Leu Phe Ala Arg Asp Gly Met Leu Ile Gly Asn Asp Tyr Met

145

150

155

160

gct ctg aag ttg gaa gga ggt ggt cac tat ttg tgt gaa ttt aaa tct 528

Ala Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly His Tyr Leu Cys Glu Phe Lys Ser

165

170

175

act tac aag gca aag aag cct gtg agg atg cca ggg tat cac tat att 576

Thr Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val Arg Met Pro Gly Tyr His Tyr Ile

180

185

190

gac cgc aaa ctg gat gta acc agt cac aac agg gat tac aca tct gtt 624

Asp Arg Lys Leu Asp Val Thr Ser His Asn Arg Asp Tyr Thr Ser Val

195

200

205

gag cag tgt gaa ata gcc att gca cgc cac tct ttg ctc ggt tga 669

Glu Gln Cys Glu Ile Ala Ile Ala Arg His Ser Leu Leu Gly

210

215

220

<210> 45

<211> 255

<212> PRT

<213> *Montipora. sp*

<400> 45

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr

1

5

10

15

Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp

20

25

30

Pro Met Val Ser Val Ile Ala Lys Gln Met Thr Tyr Lys Val Tyr Met
 35 40 45
 Ser Gly Thr Val Asn Gly His Tyr Phe Glu Val Glu Gly Asp Gly Lys
 50 55 60
 Gly Lys Pro Tyr Glu Gly Glu Gln Thr Val Lys Leu Thr Val Thr Lys
 65 70 75 80
 Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Gln Phe Gln
 85 90 95
 Tyr Gly Ser Ile Pro Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Asp Ile Pro Asp Tyr
 100 105 110
 Phe Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Thr Trp Glu Arg Ser Met Asn
 115 120 125
 Phe Glu Asp Gly Ala Val Cys Thr Val Ser Asn Asp Ser Ser Ile Gln
 130 135 140
 Gly Asn Cys Phe Ile Tyr Asn Val Lys Ile Ser Gly Glu Asn Phe Pro
 145 150 155 160
 Pro Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Gln Gly Trp Glu Pro Ser
 165 170 175
 Thr Glu Arg Leu Phe Ala Arg Asp Gly Met Leu Ile Gly Asn Asp Tyr
 180 185 190
 Met Ala Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly His Tyr Leu Cys Glu Phe Lys
 195 200 205
 Ser Thr Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val Arg Met Pro Gly Arg His Glu
 210 215 220
 Ile Asp Arg Lys Leu Asp Val Thr Ser His Asn Arg Asp Tyr Thr Ser
 225 230 235 240
 Val Glu Gln Cys Glu Ile Ala Ile Ala Arg His Ser Leu Leu Gly

245

250

255

<210> 46

<211> 765

<212> DNA

<213> *Montipora. sp*

<400> 46

atg cgg ggt tct cat cat cat cat cat cat ggt atg gct agc atg act 48

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr

1

5

10

15

ggt gga cag caa atg ggt cgg gat ctg tac gac gat gac gat aag gat 96

Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp

20

25

30

ccc atg gtg agt gtg atc gct aaa caa atg acc tac aag gtt tat atg 144

Pro Met Val Ser Val Ile Ala Lys Gln Met Thr Tyr Lys Val Tyr Met

35

40

45

tca ggc acg gtc aat gga cac tac ttt gag gtc gaa ggc gat gga aaa 192

Ser Gly Thr Val Asn Gly His Tyr Phe Glu Val Glu Gly Asp Gly Lys

50

55

60

gga aag cct tac gag gga gag cag aca gta aag ctc act gtc acc aag 240

Gly Lys Pro Tyr Glu Gly Glu Gln Thr Val Lys Leu Thr Val Thr Lys

65

70

75

80

ggt gga cct ctg cca ttt gct tgg gat att tta tca cca cag ttc cag 288

Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Gln Phe Gln

85

90

95

tac gga agc ata cca ttc acc aag tac cct gaa gac atc cct gat tat 336

Tyr Gly Ser Ile Pro Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Asp Ile Pro Asp Tyr

100

105

110

ttc aag cag tca ttc cct gag gga tat aca tgg gag agg agc atg aac 384
 Phe Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Thr Trp Glu Arg Ser Met Asn
 115 120 125
 ttt gaa gat ggt gca gtg tgt act gtc agc aat gat tcc agc atc caa 432
 Phe Glu Asp Gly Ala Val Cys Thr Val Ser Asn Asp Ser Ser Ile Gln
 130 135 140
 ggc aac tgt ttc atc tac aat gtc aaa atc tct ggt gag aac ttt cct 480
 Gly Asn Cys Phe Ile Tyr Asn Val Lys Ile Ser Gly Glu Asn Phe Pro
 145 150 155 160
 ccc aat gga cct gtt atg cag aag aag aca cag ggc tgg gaa ccc agc 528
 Pro Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Gln Gly Trp Glu Pro Ser
 165 170 175
 act gag cgt ctc ttt gca cga gat gga atg ctg ata gga aac gat tat 576
 Thr Glu Arg Leu Phe Ala Arg Asp Gly Met Leu Ile Gly Asn Asp Tyr
 180 185 190
 atg gct ctg aag ttg gaa gga ggt ggt cac tat ttg tgt gaa ttt aaa 624
 Met Ala Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly His Tyr Leu Cys Glu Phe Lys
 195 200 205
 tct act tac aag gca aag aag cct gtg agg atg cca ggg cgc cac gag 672
 Ser Thr Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val Arg Met Pro Gly Arg His Glu
 210 215 220
 att gac cgc aaa ctg gat gta acc agt cac aac agg gat tac aca tct 720
 Ile Asp Arg Lys Leu Asp Val Thr Ser His Asn Arg Asp Tyr Thr Ser
 225 230 235 240
 gtt gag cag tgt gaa ata gcc att gca cgc cac tct ttg ctc ggt 765
 Val Glu Gln Cys Glu Ile Ala Ile Ala Arg His Ser Leu Leu Gly
 245 250 255

<210> 47

<211> 255

<212> PRT

<213> *Montipora. sp*

<400> 47

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr

1 5 10 15

Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp

20 25 30

Pro Met Val Ser Val Ile Ala Lys Gln Met Thr Tyr Lys Val Tyr Met

35 40 45

Ser Gly Thr Val Asn Gly His Tyr Phe Glu Val Glu Gly Asp Gly Lys

50 55 60

Gly Lys Pro Tyr Glu Gly Glu Gln Thr Val Lys Leu Thr Val Thr Lys

65 70 75 80

Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Gln Leu Gln

85 90 95

Tyr Gly Ser Ile Pro Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Asp Ile Pro Asp Tyr

100 105 110

Phe Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Thr Trp Glu Arg Ser Met Asn

115 120 125

Phe Glu Asp Gly Ala Val Cys Thr Val Ser Asn Asp Ser Ser Ile Gln

130 135 140

Gly Asn Cys Phe Ile Tyr Asn Val Lys Ile Ser Gly Glu Asn Phe Pro

145 150 155 160

Pro Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Gln Gly Trp Glu Pro Ser

165 170 175

Thr Glu Arg Leu Phe Ala Arg Asp Gly Met Leu Ile Gly Asn Asp Tyr

180

185

190

Met Ala Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly His Tyr Leu Cys Glu Phe Lys

195

200

205

Ser Thr Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val Arg Met Pro Gly Arg His Glu

210

215

220

Ile Asp Arg Lys Leu Asp Val Thr Ser His Asn Arg Asp Tyr Thr Ser

225

230

235

240

Val Glu Gln Cys Glu Ile Ala Ile Ala Arg His Ser Leu Leu Gly

245

250

255

<210> 48

<211> 765

<212> DNA

<213> *Montipora. sp*

<400> 48

atg cgg ggt tct cat cat cat cat cat cat ggt atg gct agc atg act 48

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr

1

5

10

15

ggt gga cag caa atg ggt cgg gat ctg tac gac gat gac gat aag gat 96

Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp

20

25

30

ccc atg gtg agt gtg atc gct aaa caa atg acc tac aag gtt tat atg 144

Pro Met Val Ser Val Ile Ala Lys Gln Met Thr Tyr Lys Val Tyr Met

35

40

45

tca ggc acg gtc aat gga cac tac ttt gag gtc gaa ggc gat gga aaa 192

Ser Gly Thr Val Asn Gly His Tyr Phe Glu Val Glu Gly Asp Gly Lys

50

55

60

gga aag cct tac gag gga gag cag aca gta aag ctc act gtc acc aag 240
 Gly Lys Pro Tyr Glu Gly Glu Gln Thr Val Lys Leu Thr Val Thr Lys
 65 70 75 80
 ggt gga cct ctg cca ttt gct tgg gat att tta tca cca cag ctt cag 288
 Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Gln Leu Gln
 85 90 95
 tac gga agc ata cca ttc acc aag tac cct gaa gac atc cct gat tat 336
 Tyr Gly Ser Ile Pro Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Asp Ile Pro Asp Tyr
 100 105 110
 ttc aag cag tca ttc cct gag gga tat aca tgg gag agg agc atg aac 384
 Phe Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Thr Trp Glu Arg Ser Met Asn
 115 120 125
 ttt gaa gat ggt gca gtg tgt act gtc agc aat gat tcc agc atc caa 432
 Phe Glu Asp Gly Ala Val Cys Thr Val Ser Asn Asp Ser Ser Ile Gln
 130 135 140
 ggc aac tgt ttc atc tac aat gtc aaa atc tct ggt gag aac ttt cct 480
 Gly Asn Cys Phe Ile Tyr Asn Val Lys Ile Ser Gly Glu Asn Phe Pro
 145 150 155 160
 ccc aat gga cct gtt atg cag aag aag aca cag ggc tgg gaa ccc agc 528
 Pro Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Gln Gly Trp Glu Pro Ser
 165 170 175
 act gag cgt ctc ttt gca cga gat gga atg ctg ata gga aac gat tat 576
 Thr Glu Arg Leu Phe Ala Arg Asp Gly Met Leu Ile Gly Asn Asp Tyr
 180 185 190
 atg gct ctg aag ttg gaa gga ggt ggt cac tat ttg tgt gaa ttt aaa 624
 Met Ala Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly His Tyr Leu Cys Glu Phe Lys
 195 200 205

tct act tac aag gca aag aag cct gtg agg atg cca ggg cgc cac gag 672

Ser Thr Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val Arg Met Pro Gly Arg His Glu

210

215

220

att gac cgc aaa ctg gat gta acc agt cac aac agg gat tac aca tct 720

Ile Asp Arg Lys Leu Asp Val Thr Ser His Asn Arg Asp Tyr Thr Ser

225

230

235

240

gtt gag cag tgt gaa ata gcc att gca cgc cac tct ttg ctc ggt 765

Val Glu Gln Cys Glu Ile Ala Ile Ala Arg His Ser Leu Leu Gly

245

250

255

<210> 49

<211> 747

<212> PRT

<213> *Montipora. sp*

<400> 49

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu

1

5

10

15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly

20

25

30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile

35

40

45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr

50

55

60

Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys

65

70

75

80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu

85

90

95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu

100	105	110
Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu	Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly	
115	120	125
Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr		
130	135	140
Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn		
145	150	155
Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser		
165	170	175
Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly		
180	185	190
Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu		
195	200	205
Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe		
210	215	220
Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Ser		
225	230	235
Gly Leu Arg Ser Arg Ala Gln Ala Ser Asn Ser Ala Val Asp Gly Thr		
245	250	255
Ala Gly Pro Leu Tyr Asp Glu Val Asp Lys Asp Pro Met Ala Ser Ser		
260	265	270
Glu Asp Val Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys Val Arg Met Glu Gly		
275	280	285
Ser Val Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu Gly Glu Gly Glu Gly Arg		
290	295	300
Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys Leu Lys Val Thr Lys Gly Gly		
305	310	315
		320

Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Gln Phe Gln Tyr Gly
 325 330 335
 Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala Asp Ile Pro Asp Tyr Leu Lys
 340 345 350
 Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp Glu Arg Val Met Asn Phe Glu
 355 360 365
 Asp Gly Gly Val Val Thr Val Thr Gln Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly
 370 375 380
 Glu Phe Ile Tyr Lys Val Lys Leu Arg Gly Thr Asn Phe Pro Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met Gly Trp Glu Ala Ser Thr Glu
 405 410 415
 Arg Met Tyr Pro Glu Asp Gly Ala Leu Lys Gly Glu Ile Lys Met Arg
 420 425 430
 Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Asp Ala Glu Val Lys Thr Thr
 435 440 445
 Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro Gly Ala Tyr Lys Thr Asp
 450 455 460
 Ile Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu
 465 470 475 480
 Gln Tyr Glu Arg Ala Glu Gly Arg His Ser Thr Gly Ala Ser Gly Leu
 485 490 495
 Arg Ser Arg Ala Gln Ala Ser Asn Ser Ala Val Asp Gly Thr Ala Gly
 500 505 510
 Pro Leu Tyr Asp Glu Val Gly Lys Asp Pro Met Ala Ser Ser Glu Asp
 515 520 525
 Val Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys Val Arg Met Glu Gly Ser Val

530 535 540
Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr
545 550 555 560
Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys Leu Lys Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu
565 570 575
Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Gln Phe Gln Tyr Gly Ser Lys
580 585 590
Ala Tyr Val Lys His Pro Ala Asp Ile Pro Asp Tyr Leu Lys Leu Ser
595 600 605
Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly
610 615 620
Gly Val Val Thr Val Thr Gln Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Glu Phe
625 630 635 640
Ile Tyr Lys Val Lys Leu Arg Gly Thr Asn Phe Pro Ser Asp Gly Pro
645 650 655
Val Met Gln Lys Lys Thr Met Gly Trp Glu Ala Ser Thr Glu Arg Met
660 665 670
Tyr Pro Glu Asp Gly Ala Leu Lys Gly Glu Ile Lys Met Arg Leu Lys
675 680 685
Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Asp Ala Glu Val Lys Thr Thr Tyr Met
690 695 700
Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro Gly Ala Tyr Lys Thr Asp Ile Lys
705 710 715 720
Leu Asp Ile Thr Ser His Asn Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr
725 730 735
Glu Arg Ala Glu Gly Arg His Ser Thr Gly Ala
740 745

<210> 50

<211> 2241

<212> DNA

<213> *Montipora. sp*

<400> 50

atg gtg agc aag ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc atc ctg 48
 Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 1 5 10 15
 gtc gag ctg gac ggc gac gta aac ggc cac aag ttc agc gtg tcc ggc 96
 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30
 gag ggc gag ggc gat gcc acc tac ggc aag ctg acc ctg aag ttc atc 144
 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 35 40 45
 tgc acc acc ggc aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg acc acc 192
 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60
 ctg acc tac ggc gtg cag tgc ttc agc cgc tac ccc gac cac atg aag 240
 Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80
 cag cac gac ttc ttc aag tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc cag gag 288
 Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95
 cgc acc atc ttc ttc aag gac gac ggc aac tac aag acc cgc gcc gag 336
 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110
 gtg aag ttc gag ggc gac acc ctg gtg aac cgc atc gag ctg aag ggc 384

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125
 atc gac ttc aag gag gac ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg gag tac 432
 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 130 135 140
 aac tac aac agc cac aac gtc tat atc atg gcc gac aag cag aag aac 480
 Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160
 ggc atc aag gtg aac ttc aag atc cgc cac aac atc gag gac ggc agc 528
 Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 165 170 175
 gtg cag ctc gcc gac cac tac cag cag aac acc ccc atc ggc gac ggc 576
 Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 180 185 190
 ccc gtg ctg ctg ccc gac aac cac tac ctg agc acc cag tcc gcc ctg 624
 Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
 195 200 205
 agc aaa gac ccc aac gag aag cgc gat cac atg gtc ctg ctg gag ttc 672
 Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 210 215 220
 gtg acc gcc gcc ggg atc act ctc ggc atg gac gag ctg tac aag tcc 720
 Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Ser
 225 230 235 240
 gga ctc aga tct cga gct caa gct tcg aat tct gca gtc gac ggt acc 768
 Gly Leu Arg Ser Arg Ala Gln Ala Ser Asn Ser Ala Val Asp Gly Thr
 245 250 255
 gcg ggc ccg ctg tac gac gaa gtc gat aag gat ccg atg gcc tcc tcc 816

Ala Gly Pro Leu Tyr Asp Glu Val Asp Lys Asp Pro Met Ala Ser Ser
260 265 270
gag gac gtc atc aag gag ttc atg cgc ttc aag gtg cgc atg gag ggc 864
Glu Asp Val Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys Val Arg Met Glu Gly
275 280 285
tcc gtg aac ggc cac gag ttc gag atc gag ggc gag ggc gag ggc cgc 912
Ser Val Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu Gly Glu Gly Glu Gly Arg
290 295 300
ccc tac gag ggc acc cag acc gcc aag ctg aag gtg acc aag ggc ggc 960
Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys Leu Lys Val Thr Lys Gly Gly
305 310 315 320
ccc ctg ccc ttc gcc tgg gac atc ctg tcc cct cag ttc cag tac ggc 1008
Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Gln Phe Gln Tyr Gly
325 330 335
tcc aag gcc tac gtg aag cac ccc gcc gac atc ccc gac tac ttg aag 1056
Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala Asp Ile Pro Asp Tyr Leu Lys
340 345 350
ctg tcc ttc ccc gag ggc ttc aag tgg gag cgc gtg atg aac ttc gag 1104
Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp Glu Arg Val Met Asn Phe Glu
355 360 365
gac ggc ggc gtg gtg acc gtg acc cag gac tcc tcc ctg cag gac ggc 1152
Asp Gly Gly Val Val Thr Val Thr Gln Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly
370 375 380
gag ttc atc tac aag gtg aag ctg cgc ggc acc aac ttc ccc tcc gac 1200
Glu Phe Ile Tyr Lys Val Lys Leu Arg Gly Thr Asn Phe Pro Ser Asp
385 390 395 400
ggc ccc gta atg cag aag aag acc atg ggc tgg gag gcc tcc acc gag 1248

Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met Gly Trp Glu Ala Ser Thr Glu
 405 410 415
 cgg atg tac ccc gag gac ggc gcc ctg aag ggc gag atc aag atg agg 1296
 Arg Met Tyr Pro Glu Asp Gly Ala Leu Lys Gly Glu Ile Lys Met Arg
 420 425 430
 ctg aag ctg aag gac ggc ggc cac tac gac gcc gag gtc aag acc acc 1344
 Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Asp Ala Glu Val Lys Thr Thr
 435 440 445
 tac atg gcc aag aag ccc gtg cag ctg ccc ggc gcc tac aag acc gac 1392
 Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro Gly Ala Tyr Lys Thr Asp
 450 455 460
 atc aag ctg gac atc acc tcc cac aac gag gac tac acc atc gtg gaa 1440
 Ile Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu
 465 470 475 480
 cag tac gag cgc gcc gag ggc cgc cac tcc acc ggc gcc tcc gga ctc 1488
 Gln Tyr Glu Arg Ala Glu Gly Arg His Ser Thr Gly Ala Ser Gly Leu
 485 490 495
 aga tct cga gct caa gct tcg aat tct gca gtc gac ggt acc gcg ggc 1536
 Arg Ser Arg Ala Gln Ala Ser Asn Ser Ala Val Asp Gly Thr Ala Gly
 500 505 510
 ccg ctg tac gac gaa gtc ggt aag gat ccg atg gcc tcc tcc gag gac 1584
 Pro Leu Tyr Asp Glu Val Gly Lys Asp Pro Met Ala Ser Ser Glu Asp
 515 520 525
 gtc atc aag gag ttc atg cgc ttc aag gtg cgc atg gag ggc tcc gtg 1632
 Val Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys Val Arg Met Glu Gly Ser Val
 530 535 540
 aac ggc cac gag ttc gag atc gag ggc gag ggc gag ggc cgc ccc tac 1680

Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr
545 550 555 560
gag ggc acc cag acc gcc aag ctg aag gtg acc aag ggc ggc ccc ctg 1728
Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys Leu Lys Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu
565 570 575
ccc ttc gcc tgg gac atc ctg tcc cct cag ttc cag tac ggc tcc aag 1776
Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Gln Phe Gln Tyr Gly Ser Lys
580 585 590
gcc tac gtg aag cac ccc gcc gac atc ccc gac tac ttg aag ctg tcc 1824
Ala Tyr Val Lys His Pro Ala Asp Ile Pro Asp Tyr Leu Lys Leu Ser
595 600 605
ttc ccc gag ggc ttc aag tgg gag cgc gtg atg aac ttc gag gac ggc 1872
Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly
610 615 620
ggc gtg gtg acc gtg acc cag gac tcc tcc ctg cag gac ggc gag ttc 1920
Gly Val Val Thr Val Thr Gln Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Glu Phe
625 630 635 640
atc tac aag gtg aag ctg cgc ggc acc aac ttc ccc tcc gac ggc ccc 1968
Ile Tyr Lys Val Lys Leu Arg Gly Thr Asn Phe Pro Ser Asp Gly Pro
645 650 655
gta atg cag aag aag acc atg ggc tgg gag gcc tcc acc gag cgg atg 2016
Val Met Gln Lys Lys Thr Met Gly Trp Glu Ala Ser Thr Glu Arg Met
660 665 670
tac ccc gag gac ggc gcc ctg aag ggc gag atc aag atg agg ctg aag 2064
Tyr Pro Glu Asp Gly Ala Leu Lys Gly Glu Ile Lys Met Arg Leu Lys
675 680 685
ctg aag gac ggc ggc cac tac gac gcc gag gtc aag acc acc tac atg 2112

Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Asp Ala Glu Val Lys Thr Thr Tyr Met
 690 695 700
 gcc aag aag ccc gtg cag ctg ccc ggc gcc tac aag acc gac atc aag 2160
 Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro Gly Ala Tyr Lys Thr Asp Ile Lys
 705 710 715 720
 ctg gac atc acc tcc cac aac gag gac tac acc atc gtg gaa cag tac 2208
 Leu Asp Ile Thr Ser His Asn Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr
 725 730 735
 gag cgc gcc gag ggc cgc cac tcc acc ggc gcc 2241
 Glu Arg Ala Glu Gly Arg His Ser Thr Gly Ala
 740 745

<210> 51

<211> 507

<212> PRT

<213> *Montipora. sp*

<400> 51

Met Arg Gly Ser His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr
 1 5 10 15
 Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp
 20 25 30
 Pro Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile
 35 40 45
 Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser
 50 55 60
 Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe
 65 70 75 80
 Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr

94/121

Asn Gly His Tyr Phe Glu Val Glu Gly Asp Gly Lys Gly Lys Pro Tyr
305 310 315 320
Glu Gly Glu Gln Thr Val Lys Leu Thr Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu
325 330 335
Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Leu Phe Gln Tyr Gly Ser Ile
340 345 350
Pro Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Asp Ile Pro Asp Tyr Val Lys Gln Ser
355 360 365
Phe Pro Glu Gly Tyr Thr Trp Glu Arg Thr Met Asn Phe Glu Asp Gly
370 375 380
Ala Val Cys Thr Val Ser Asn Asp Ser Ser Ile Gln Gly Asn Cys Phe
385 390 395 400
Ile Tyr Asn Val Lys Ile Ser Gly Thr Asn Phe Pro Pro Asn Gly Pro
405 410 415
Val Met Gln Lys Lys Thr Gln Gly Trp Glu Pro Ser Thr Glu Arg Leu
420 425 430
Phe Ala Arg Asp Gly Met Leu Ile Gly Asn Asp Tyr Met Ala Leu Lys
435 440 445
Leu Glu Gly Gly Gly His Tyr Leu Cys Glu Phe Lys Ser Thr Tyr Lys
450 455 460
Ala Lys Lys Pro Val Arg Met Pro Gly Tyr His Tyr Ile Asp Arg Lys
465 470 475 480
Leu Asp Val Thr Ser His Asn Arg Asp Tyr Thr Ser Val Glu Gln Cys
485 490 495
Glu Ile Ala Ile Ala Arg His Ser Leu Leu Gly
500 505

<210> 52

<211> 1521

<212> DNA

<213> *Montipora. sp*

<400> 52

atg cgg ggt tct cat cat cat cat cat cat ggt atg gct agc atg act 48

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr

1

5

10

15

ggt gga cag caa atg ggt cgg gat ctg tac gac gat gac gat aag gat 96

Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp

20

25

30

ccc atg gtg agc aag ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc atc 144

Pro Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile

35

40

45

ctg gtc gag ctg gac ggc gac gta aac ggc cac aag ttc agc gtg tcc 192

Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser

50

55

60

ggc gag ggc gag ggc gat gcc acc tac ggc aag ctg acc ctg aag ttc 240

Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe

65

70

75

80

atc tgc acc acc ggc aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg acc 288

Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr

85

90

95

acc ctg acc tgg ggc gtg cag tgc ttc agc cgc tac ccc gac cac atg 336

Thr Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met

100

105

110

aag cag cac gac ttc ttc aag tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc cag 384

Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln

115 120 125
gag cgc acc atc ttc ttc aag gac gac ggc aac tac aag acc cgc gcc 432
Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala
130 135 140
gag gtg aag ttc gag ggc gac acc ctg gtg aac cgc atc gag ctg aag 480
Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys
145 150 155 160
ggc atc gac ttc aag gag gac ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg gag 528
Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu
165 170 175
tac aac tac atc agc cac aac gtc tat atc acc gcc gac aag cag aag 576
Tyr Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys
180 185 190
aac ggc atc aag gcc aac ttc aag atc cgc cac aac atc gag gac ggc 624
Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly
195 200 205
agc gtg cag ctc gcc gac cac tac cag cag aac acc ccc atc ggc gac 672
Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp
210 215 220
ggc ccc gtg ctg ctg ccc gac aac cac tac ctg agc acc cag tcc gcc 720
Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala
225 230 235 240
ctg agc aaa gac ccc aac gag aag cgc gat cac atg gtc ctg ctg gag 768
Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu
245 250 255
ttc gtg acc gcc gcc ggg atc act ctc ggc atg gac gag ctg tac aag 816
Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys

260	265	270	
tcc tcg tcc gag ctc agc gga gat gag gtc gat ggt acc atg gtg agt	864		
Ser Ser Ser Glu Leu Ser Gly Asp Glu Val Asp Gly Thr Met Val Ser			
275	280	285	
gtg atc gct aaa caa atg acc tac aag gtt tat atg tca ggc acg gtc	912		
Val Ile Ala Lys Gln Met Thr Tyr Lys Val Tyr Met Ser Gly Thr Val			
290	295	300	
aat gga cac tac ttt gag gtc gaa ggc gat gga aaa gga aag cct tac	960		
Asn Gly His Tyr Phe Glu Val Glu Gly Asp Gly Lys Gly Lys Pro Tyr			
305	310	315	320
gag gga gag cag aca gta aag ctc act gtc acc aag ggt gga cct ctg	1008		
Glu Gly Glu Gln Thr Val Lys Leu Thr Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu			
325	330	335	
cca ttt gct tgg gat att tta tca cca ctg ttt cag tac gga agc ata	1056		
Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Leu Phe Gln Tyr Gly Ser Ile			
340	345	350	
cca ttc acc aag tac cct gaa gac atc cct gat tat gta aag cag tca	1104		
Pro Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Asp Ile Pro Asp Tyr Val Lys Gln Ser			
355	360	365	
ttc cct gag gga tat aca tgg gag agg acc atg aac ttt gaa gat ggt	1152		
Phe Pro Glu Gly Tyr Thr Trp Glu Arg Thr Met Asn Phe Glu Asp Gly			
370	375	380	
gca gtg tgt act gtc agc aat gat tcc agc atc caa ggc aac tgt ttc	1200		
Ala Val Cys Thr Val Ser Asn Asp Ser Ser Ile Gln Gly Asn Cys Phe			
385	390	395	400
atc tac aat gtc aaa atc tct ggt acg aac ttt cct ccc aat gga cct	1248		
Ile Tyr Asn Val Lys Ile Ser Gly Thr Asn Phe Pro Pro Asn Gly Pro			

405 410 415
 gtt atg cag aag aag aca cag ggc tgg gaa ccc agc act gag cgt ctc 1296
 Val Met Gln Lys Lys Thr Gln Gly Trp Glu Pro Ser Thr Glu Arg Leu
 420 425 430
 ttt gca cga gat gga atg ctg ata gga aac gat tat atg gct ctg aag 1344
 Phe Ala Arg Asp Gly Met Leu Ile Gly Asn Asp Tyr Met Ala Leu Lys
 435 440 445
 ttg gaa gga ggt ggt cac tat ttg tgt gaa ttt aaa tct act tac aag 1392
 Leu Glu Gly Gly Gly His Tyr Leu Cys Glu Phe Lys Ser Thr Tyr Lys
 450 455 460
 gca aag aag cct gtg agg atg cca ggg tat cac tat att gac cgc aaa 1440
 Ala Lys Lys Pro Val Arg Met Pro Gly Tyr His Tyr Ile Asp Arg Lys
 465 470 475 480
 ctg gat gta acc agt cac aac agg gat tac aca tct gtt gag cag tgt 1488
 Leu Asp Val Thr Ser His Asn Arg Asp Tyr Thr Ser Val Glu Gln Cys
 485 490 495
 gaa ata gcc att gca cgc cac tct ttg ctc ggt 1521
 Glu Ile Ala Ile Ala Arg His Ser Leu Leu Gly

500

505

<210> 53

<211> 507

<212> PRT

<213> *Montipora. sp*

<400> 53

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr

1

5

10

15

Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp

	20		25		30
Pro Met Val Ser Val Ile Ala Lys Gln Met Thr Tyr Lys Val Tyr Met					
	35		40		45
Ser Gly Thr Val Asn Gly His Tyr Phe Glu Val Glu Gly Asp Gly Lys					
	50		55		60
Gly Lys Pro Tyr Glu Gly Glu Gln Thr Val Lys Leu Thr Val Thr Lys					
	65		70		75
Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Leu Phe Gln					
		85		90	
Tyr Gly Ser Ile Pro Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Asp Ile Pro Asp Tyr					
	100		105		110
Val Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Thr Trp Glu Arg Thr Met Asn					
	115		120		125
Phe Glu Asp Gly Ala Val Cys Thr Val Ser Asn Asp Ser Ser Ile Gln					
	130		135		140
Gly Asn Cys Phe Ile Tyr Asn Val Lys Ile Ser Gly Thr Asn Phe Pro					
	145		150		155
Pro Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Gln Gly Trp Glu Pro Ser					
		165		170	
Thr Glu Arg Leu Phe Ala Arg Asp Gly Met Leu Ile Gly Asn Asp Tyr					
	180		185		190
Met Ala Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly His Tyr Leu Cys Glu Phe Lys					
	195		200		205
Ser Thr Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val Arg Met Pro Gly Tyr His Tyr					
	210		215		220
Ile Asp Arg Lys Leu Asp Val Thr Ser His Asn Arg Asp Tyr Thr Ser					
	225		230		235
					240

Val	Glu	Gln	Cys	Glu	Ile	Ala	Ile	Ala	Arg	His	Ser	Leu	Leu	Gly	Ser			
				245					250					255				
Ser	Ser	Glu	Leu	Ser	Gly	Asp	Glu	Val	Asp	Gly	Thr	Met	Val	Ser	Lys			
				260					265					270				
Gly	Glu	Glu	Leu	Phe	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ile	Leu	Val	Glu	Leu	Asp			
				275					280					285				
Gly	Asp	Val	Asn	Gly	His	Lys	Phe	Ser	Val	Ser	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly			
				290					295					300				
Asp	Ala	Thr	Tyr	Gly	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile	Cys	Thr	Thr	Gly			
305						310					315				320			
Lys	Leu	Pro	Val	Pro	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr	Leu	Thr	Trp	Gly			
				325						330					335			
Val	Gln	Cys	Phe	Ser	Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Lys	Gln	His	Asp	Phe			
				340					345					350				
Phe	Lys	Ser	Ala	Met	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu	Arg	Thr	Ile	Phe			
				355					360					365				
Phe	Lys	Asp	Asp	Gly	Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu	Val	Lys	Phe	Glu			
				370					375					380				
Gly	Asp	Thr	Leu	Val	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys			
385						390					395				400			
Glu	Asp	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Ser			
				405						410					415			
His	Asn	Val	Tyr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn	Gly	Ile	Lys	Ala			
				420					425					430				
Asn	Phe	Lys	Ile	Arg	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser	Val	Gln	Leu	Ala			
				435					440					445				
Asp	His	Tyr	Gln	Gln	Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly	Pro	Val	Leu	Leu			

450 455 460
 Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro
 465 470 475 480
 Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala
 485 490 495
 Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 500 505
 <210> 54
 <211> 1521
 <212> DNA
 <213> *Montipora. sp*
 <400> 54
 atg cgg ggt tct cat cat cat cat cat cat ggt atg gct agc atg act 48
 Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr
 1 5 10 15
 ggt gga cag caa atg ggt cgg gat ctg tac gac gat gac gat aag gat 96
 Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp
 20 25 30
 ccc atg gtg agt gtg atc gct aaa caa atg acc tac aag gtt tat atg 144
 Pro Met Val Ser Val Ile Ala Lys Gln Met Thr Tyr Lys Val Tyr Met
 35 40 45
 tca ggc acg gtc aat gga cac tac ttt gag gtc gaa ggc gat gga aaa 192
 Ser Gly Thr Val Asn Gly His Tyr Phe Glu Val Glu Gly Asp Gly Lys
 50 55 60
 gga aag cct tac gag gga gag cag aca gta aag ctc act gtc acc aag 240
 Gly Lys Pro Tyr Glu Gly Glu Gln Thr Val Lys Leu Thr Val Thr Lys
 65 70 75 80

ggt gga cct ctg cca ttt gct tgg gat att tta tca cca ctg ttt cag 288
Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Leu Phe Gln
85 90 95
tac gga agc ata cca ttc acc aag tac cct gaa gac atc cct gat tat 336
Tyr Gly Ser Ile Pro Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Asp Ile Pro Asp Tyr
100 105 110
gta aag cag tca ttc cct gag gga tat aca tgg gag agg acc atg aac 384
Val Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Thr Trp Glu Arg Thr Met Asn
115 120 125
ttt gaa gat ggt gca gtg tgt act gtc agc aat gat tcc agc atc caa 432
Phe Glu Asp Gly Ala Val Cys Thr Val Ser Asn Asp Ser Ser Ile Gln
130 135 140
ggc aac tgt ttc atc tac aat gtc aaa atc tct ggt acg aac ttt cct 480
Gly Asn Cys Phe Ile Tyr Asn Val Lys Ile Ser Gly Thr Asn Phe Pro
145 150 155 160
ccc aat gga cct gtt atg cag aag aag aca cag ggc tgg gaa ccc agc 528
Pro Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Gln Gly Trp Glu Pro Ser
165 170 175
act gag cgt ctc ttt gca cga gat gga atg ctg ata gga aac gat tat 576
Thr Glu Arg Leu Phe Ala Arg Asp Gly Met Leu Ile Gly Asn Asp Tyr
180 185 190
atg gct ctg aag ttg gaa gga ggt ggt cac tat ttg tgt gaa ttt aaa 624
Met Ala Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly His Tyr Leu Cys Glu Phe Lys
195 200 205
tct act tac aag gca aag aag cct gtg agg atg cca ggg tat cac tat 672
Ser Thr Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val Arg Met Pro Gly Tyr His Tyr
210 215 220

att gac cgc aaa ctg gat gta acc agt cac aac agg gat tac aca tct 720
Ile Asp Arg Lys Leu Asp Val Thr Ser His Asn Arg Asp Tyr Thr Ser
225 230 235 240
gtt gag cag tgt gaa ata gcc att gca cgc cac tct ttg ctc ggt tcc 768
Val Glu Gln Cys Glu Ile Ala Ile Ala Arg His Ser Leu Leu Gly Ser
245 250 255
tcg tcc gag ctc agc gga gat gag gtc gat ggt acc atg gtg agc aag 816
Ser Ser Glu Leu Ser Gly Asp Glu Val Asp Gly Thr Met Val Ser Lys
260 265 270
ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc atc ctg gtc gag ctg gac 864
Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp
275 280 285
ggc gac gta aac ggc cac aag ttc agc gtg tcc ggc gag ggc gag ggc 912
Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly
290 295 300
gat gcc acc tac ggc aag ctg acc ctg aag ttc atc tgc acc acc ggc 960
Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly
305 310 315 320
aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg acc acc ctg acc tgg ggc 1008
Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Trp Gly
325 330 335
gtg cag tgc ttc agc cgc tac ccc gac cac atg aag cag cac gac ttc 1056
Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe
340 345 350
ttc aag tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc cag gag cgc acc atc ttc 1104
Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe
355 360 365

ttc aag gac gac ggc aac tac aag acc cgc gcc gag gtg aag ttc gag 1152

Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu

370

375

380

ggc gac acc ctg gtg aac cgc atc gag ctg aag ggc atc gac ttc aag 1200

Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys

385

390

395

400

gag gac ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg gag tac aac tac atc agc 1248

Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Ile Ser

405

410

415

cac aac gtc tat atc acc gcc gac aag cag aag aac ggc atc aag gcc 1296

His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala

420

425

430

aac ttc aag atc cgc cac aac atc gag gac ggc agc gtg cag ctc gcc 1344

Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala

435

440

445

gac cac tac cag cag aac acc ccc atc ggc gac ggc ccc gtg ctg ctg 1392

Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu

450

455

460

ccc gac aac cac tac ctg agc acc cag tcc gcc ctg agc aaa gac ccc 1440

Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro

465

470

475

480

aac gag aag cgc gat cac atg gtc ctg ctg gag ttc gtg acc gcc gcc 1488

Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala

485

490

495

ggg atc act ctc ggc atg gac gag ctg tac aag

1521

Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys

500

505

<210> 55

<211> 411

<212> PRT

<213> *Montipora. sp*

<400> 55

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr

1 5 10 15

Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp

20 25 30

Pro Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile

35 40 45

Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Arg Phe Ser Val Ser

50 55 60

Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe

65 70 75 80

Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr

85 90 95

Thr Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met

100 105 110

Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln

115 120 125

Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala

130 135 140

Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys

145 150 155 160

Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu

165 170 175

Tyr Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys
180 185 190
Asn Gly Ile Lys Ala His Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly
195 200 205
Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp
210 215 220
Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala
225 230 235 240
Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu
245 250 255
Phe Val Thr Ala Ala Arg Met His Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile
260 265 270
Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly
275 280 285
Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln
290 295 300
Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala
305 310 315 320
Asp Gly Asn Gly Thr Ile Tyr Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala
325 330 335
Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe
340 345 350
Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu
355 360 365
Arg His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val
370 375 380
Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn

108/121

Thr Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met
 100 105 110
 aag cag cac gac ttc ttc aag tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc cag 384
 Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln
 115 120 125
 gag cgc acc atc ttc ttc aag gac gac ggc aac tac aag acc cgc gcc 432
 Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala
 130 135 140
 gag gtg aag ttc gag ggc gac acc ctg gtg aac cgc atc gag ctg aag 480
 Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys
 145 150 155 160
 ggc atc gac ttc aag gag gac ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg gag 528
 Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu
 165 170 175
 tac aac tat atc agc cac aac gtc tat atc acc gcc gac aag cag aag 576
 Tyr Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys
 180 185 190
 aac ggc atc aag gcc cac ttc aag atc cgc cac aac atc gag gac ggc 624
 Asn Gly Ile Lys Ala His Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly
 195 200 205
 agc gtg cag ctc gcc gac cac tac cag cag aac acc ccc atc ggc gac 672
 Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp
 210 215 220
 ggc ccc gtg ctg ctg ccc gac aac cac tac ctg agc acc cag tcc gcc 720
 Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala
 225 230 235 240
 ctg agc aaa gac ccc aac gag aag cgc gat cac atg gtc ctg ctg gag 768

Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu
 245 250 255
 ttc gtg acc gcc gcc cgc atg cat gac caa ctg aca gaa gag cag att 816
 Phe Val Thr Ala Ala Arg Met His Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile
 260 265 270
 gca gag ttc aaa gaa gcc ttc tca tta ttc gac aag gat ggg gac ggc 864
 Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly
 275 280 285
 acc atc acc aca aag gaa ctt ggc acc gtt atg agg tcg ctt gga caa 912
 Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln
 290 295 300
 aac cca acg gaa gca gaa ttg cag gat atg atc aat gaa gtc gat gct 960
 Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala
 305 310 315 320
 gat ggc aat gga acg att tac ttt cct gaa ttt ctt act atg atg gct 1008
 Asp Gly Asn Gly Thr Ile Tyr Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala
 325 330 335
 aga aaa atg aag gac aca gac agc gaa gag gaa atc cga gaa gca ttc 1056
 Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe
 340 345 350
 cgt gtt ttt gac aag gat ggg aac ggc tac atc agc gct gct gaa tta 1104
 Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu
 355 360 365
 cgt cac gtc atg aca aac ctc ggg gag aag tta aca gat gaa gaa gtt 1152
 Arg His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val
 370 375 380
 gat gaa atg ata agg gaa gca gat atc gat ggt gat ggc caa gta aac 1200

Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn
 385 390 395 400
 tat gaa gag ttt gta caa atg atg aca gca aag 1233
 Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys

405 410

<210> 57

<211> 288

<212> PRT

<213> *Montipora. sp*

<400> 57

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr
 1 5 10 15
 Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp
 20 25 30
 Pro Lys Arg Arg Trp Lys Lys Asn Phe Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn
 35 40 45
 Arg Phe Lys Lys Ile Ser Ser Ser Gly Ala Leu Gly Gly Gly Gly Ser
 50 55 60
 Glu Leu Met Val Ser Val Ile Ala Lys Gln Met Thr Tyr Lys Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Ser Gly Thr Val Asn Gly His Tyr Phe Glu Val Glu Gly Asp Gly
 85 90 95
 Lys Gly Lys Pro Tyr Glu Gly Glu Gln Thr Val Lys Leu Thr Val Thr
 100 105 110
 Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Leu Phe
 115 120 125
 Gln Tyr Gly Ser Ile Pro Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Asp Ile Pro Asp

130	135	140			
Tyr Val Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Thr Trp Glu Arg Thr Met					
145	150	155	160		
Asn Phe Glu Asp Gly Ala Val Cys Thr Val Ser Asn Asp Ser Ser Ile					
	165	170	175		
Gln Gly Asn Cys Phe Ile Tyr Asn Val Lys Ile Ser Gly Thr Asn Phe					
	180	185	190		
Pro Pro Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Gln Gly Trp Glu Pro					
	195	200	205		
Ser Thr Glu Arg Leu Phe Ala Arg Asp Gly Met Leu Ile Gly Asn Asp					
	210	215	220		
Tyr Met Ala Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly His Tyr Leu Cys Glu Phe					
225	230	235	240		
Lys Ser Thr Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val Arg Met Pro Gly Tyr His					
	245	250	255		
Tyr Ile Asp Arg Lys Leu Asp Val Thr Ser His Asn Arg Asp Tyr Thr					
	260	265	270		
Ser Val Glu Gln Cys Glu Ile Ala Ile Ala Arg His Ser Leu Leu Gly					
	275	280	285		

<210> 58

<211> 864

<212> DNA

<213> *Montipora. sp*

<400> 58

atg cgg ggt tct cat cat cat cat cat cat ggt atg gct agc atg act 48

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr

1

5

10

15

ggt gga cag caa atg ggt cgg gat ctg tac gac gat gac gat aag gat 96
 Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp
 20 25 30
 ccc aag agg cgc tgg aag aaa aac ttc att gcc gtc agc gct gcc aac 144
 Pro Lys Arg Arg Trp Lys Lys Asn Phe Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn
 35 40 45
 cgg ttc aag aag atc tcc agc tcc ggg gca ctg gga ggt gga ggt agt 192
 Arg Phe Lys Lys Ile Ser Ser Ser Gly Ala Leu Gly Gly Gly Gly Ser
 50 55 60
 gag ctc atg gtg agt gtg atc gct aaa caa atg acc tac aag gtt tat 240
 Glu Leu Met Val Ser Val Ile Ala Lys Gln Met Thr Tyr Lys Val Tyr
 65 70 75 80
 atg tca ggc acg gtc aat gga cac tac ttt gag gtc gaa ggc gat gga 288
 Met Ser Gly Thr Val Asn Gly His Tyr Phe Glu Val Glu Gly Asp Gly
 85 90 95
 aaa gga aag cct tac gag gga gag cag aca gta aag ctc act gtc acc 336
 Lys Gly Lys Pro Tyr Glu Gly Glu Gln Thr Val Lys Leu Thr Val Thr
 100 105 110
 aag ggt gga cct ctg cca ttt gct tgg gat att tta tca cca ctg ttt 384
 Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Leu Phe
 115 120 125
 cag tac gga agc ata cca ttc acc aag tac cct gaa gac atc cct gat 432
 Gln Tyr Gly Ser Ile Pro Phe Thr Lys Tyr Pro Glu Asp Ile Pro Asp
 130 135 140
 tat gta aag cag tca ttc cct gag gga tat aca tgg gag agg acc atg 480
 Tyr Val Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Tyr Thr Trp Glu Arg Thr Met
 145 150 155 160

aac ttt gaa gat ggt gca gtg tgt act gtc agc aat gat tcc agc atc 528
Asn Phe Glu Asp Gly Ala Val Cys Thr Val Ser Asn Asp Ser Ser Ile
165 170 175
caa ggc aac tgt ttc atc tac aat gtc aaa atc tct ggt acg aac ttt 576
Gln Gly Asn Cys Phe Ile Tyr Asn Val Lys Ile Ser Gly Thr Asn Phe
180 185 190
cct ccc aat gga cct gtt atg cag aag aag aca cag ggc tgg gaa ccc 624
Pro Pro Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Gln Gly Trp Glu Pro
195 200 205
agc act gag cgt ctc ttt gca cga gat gga atg ctg ata gga aac gat 672
Ser Thr Glu Arg Leu Phe Ala Arg Asp Gly Met Leu Ile Gly Asn Asp
210 215 220
tat atg gct ctg aag ttg gaa gga ggt ggt cac tat ttg tgt gaa ttt 720
Tyr Met Ala Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly His Tyr Leu Cys Glu Phe
225 230 235 240
aaa tct act tac aag gca aag aag cct gtg agg atg cca ggg tat cac 768
Lys Ser Thr Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val Arg Met Pro Gly Tyr His
245 250 255
tat att gac cgc aaa ctg gat gta acc agt cac aac agg gat tac aca 816
Tyr Ile Asp Arg Lys Leu Asp Val Thr Ser His Asn Arg Asp Tyr Thr
260 265 270
tct gtt gag cag tgt gaa ata gcc att gca cgc cac tct ttg ctc ggt 864
Ser Val Glu Gln Cys Glu Ile Ala Ile Ala Arg His Ser Leu Leu Gly
275 280 285

<210> 59

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 59

ccagagatga agatgaggta ctacatggac ggc

33

<210> 60

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 60

catgagttca caattgaagg tgaaggc

27

<210> 61

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 61

gaaggcacag gcagacctta cgaggga

27

<210> 62

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 62

ccaatgcctt tcgcgtttga cttagtg

27

<210> 63

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 63

ttagtgtcac acgtgttctg ttacggc

27

<210> 64

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 64

gaaaggtcgt tggagttcga agatggt

27

<210> 65

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 65

gaagatggtg ggtccgcttc agtcagtgcg

30

<210> 66

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 66

agccttagag gaaacacctt ctaccacaaa tcca

34

<210> 67

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 67

caaatccaaa ttactgggg ttaactttcc tg

32

<210> 68

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 68

gccgatggtc ctatcatgca aaaccaaagt

30

<210> 69

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 69

gccgatggtc ctatcatgca aaaccaaagt gttgattggg agcca 45

<210> 70

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 70

gagaaaatta ctgccagcga cggagttctg aag 33

<210> 71

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 71

gatgttacga tgtacctaaa acttgaagga ggcggcaatc ac 42

<210> 72

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 72

cttaaaatgc caggaagcca ttacatcagc catcgccctcg tcagg 45

<210> 73

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 73

gatgcagtag ctcattccct cgagcaccac cacc 34

<210> 74

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 74

gaaggrtgyg tcaayggrca y 21

<210> 75

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 75

acvggdccat ydgvaagaaa rtt 23

<210> 76

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 76

ggccacgcgt cgactagtac gggiigggii gggiig 36

<210> 77

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 77

ctcagggaat gactgcttta cat 23

<210> 78

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 78

ggccacgcgt cgactagtac 20

<210> 79

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 79

gtcttcaggg tacttggtga 20

<210> 80

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 80

atgtaaagca gtcattccct gag 23

<210> 81

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 81

cccgatccg accatggcta ccttggttaa aga 33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018437

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C12N15/09, C12N1/21, C12N5/10, C07K14/435, C07K19/00, C12Q1/02, G01N21/78, G01N33/50, G01N33/533 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ C12N15/09, C12N1/21, C12N5/10, C07K14/435, C07K19/00, C12Q1/02, G01N21/78, G01N33/50, G01N33/533 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) SwissProt/PIR/Geneseq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), MEDLINE (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Campbell, R.E. et al., A monomeric red fluorescent protein. Proc.Natl.Acad.Sci. USA., Vol.99, No.12, pages 7877 to 7882 (2002)	1-18, 21, 24-36
Y	KARASAWA, S. et al., A green-emitting fluorescent protein from Galaxeidae coral and its monomeric version for use in fluorescent labeling. J.Biol. Chem., Vol.278, No.36, pages 34167 to 37171 (05 September, 2003 (05.09.03))	1-18, 21, 24-36
Y	WO 03/054191 A1 (The Institute of Physical and Chemical Research), 03 July, 2003 (03.07.03), & EP 1464701 A1	1-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 05 January, 2005 (05.01.05)		Date of mailing of the international search report 25 January, 2005 (25.01.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018437

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 02/070703 A2 (Nufarm Ltd.), 12 September, 2002 (12.09.02), & EP 1390499 A2	19-36 21, 24, 27-36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018437

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The amino acid sequences represented by SEQ ID NOS:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27 and 29 have homologies of 50% or less with the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS:37, 39, 41, 43, 45 and 47 and, therefore, these amino acid sequences have no fundamental skeleton in common.

Concerning the monomerized sequences of SEQ ID NOS:45 and 47, it has been publicly known to monomerize a coral-origin fluorescent protein per se, as reported in the following documents 1 and 2. Thus, these sequences cannot be considered as a special technical feature in the meaning within PCT Rule 13.2.

Such being the case, the inventions relating (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018437

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

to SEQ ID NOS:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27 and 29 and the inventions relating to SEQ ID NOS:37, 39, 41, 43, 45 and 47 cannot be considered as a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept. It is recognized that claims of the present case have two groups of inventions.

Document 1: Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Vol.99, No.12, pp.7877-7882 (2002)
Document 2: J.Biol.Chem., Vol.278, No.36, pp.34167-37171 (05 September, 2003 (05.09.03))

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 C12N15/09、C12N1/21、C12N5/10、C07K14/435、C07K19/00、C12Q1/02、G01N21/78、G01N33/50、G01N33/533

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 C12N15/09、C12N1/21、C12N5/10、C07K14/435、C07K19/00、C12Q1/02、G01N21/78、G01N33/50、G01N33/533

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/Geneseq、
WPI (DIALOG)、BIOSIS (DIALOG)、JSTPlus (JOIS)、MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Campbell, R. E. et al., A monomeric red fluorescent protein. Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 99, No. 12, pp. 7877-7882 (2002)	1-18, 21, 24-36
Y	Karasawa, S. et al., A green-emitting fluorescent protein from Galaxeidae coral and its monomeric version for use in fluorescent labeling. J Biol Chem, Vol. 278, No. 36, pp. 34167-37171 (2003 Sep 5)	1-18, 21, 24-36

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05.01.2005

国際調査報告の発送日

25.1.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 明 照

4N

8412

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 03/054191 A1 (理化学研究所) 2003.07.03 & EP 1464701 A1	1-18
X	WO 02/070703 A2 (Nufarm Ltd) 2002.09.12	19-36
Y	& EP 1390499 A2	21, 24, 27-36

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29に記載されたアミノ酸配列と配列番号37, 39, 41, 43, 45, 47に記載されたアミノ酸配列とは同一性50%以下であり、共通する基本骨格を有するとは言えない。

なお、単量体化された配列番号45, 47についても下記文献1, 2にも記載されているように、サング由来の蛍光蛋白質を単量体化すること自体が公知であるから、PCT規則13.2における特別な技術的特徴であるとはいえない。

したがって、配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29に係る発明群と配列番号37, 39, 41, 43, 45, 47に係る発明群とは、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえず、本願の請求の範囲には2個の発明が記載されているものと認められる。

文献1 : Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 99, No. 12, pp. 7877-7882 (2002)

文献2 : J Biol Chem, Vol. 278, No. 36, pp. 34167-37171 (2003 Sep 5)

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。